


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :  <b>A61K 39/145, 39/295, 9/127, 39/39, B05B 11/00, A61P 11/02</b>	<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/27430</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>18. Mai 2000 (18.05.00)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/08557</b>  (22) Internationales Anmeldedatum: <b>8. November 1999 (08.11.99)</b>  (30) Prioritätsdaten: <b>198 51 282.1        6. November 1998 (06.11.98)    DE</b>  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>SCHWEIZ. SERUM- &amp; IMPFINSTITUT BERN [CH/CH];</b> <b>Postfach, CH-3001 Bern (CH).</b>  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>GLÜCK, R. [CH/CH]; Chas-</b> <b>eralstrasse 156, CH-3095 Spiegel Bern (CH). GLÜCK, U.</b> <b>[CH/CH]; Flossenmatt 12, CH-6045 Meggen/Luzern (CH).</b> <b>COLLIOUD, André [CH/CH]; Rütibühlweg 10, CH-3073</b> <b>Gümligen (CH).</b>  (74) Anwalt: <b>VOSSIUS &amp; PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675</b> <b>München (DE).</b>		(81) Bestimmungsstaaten: <b>AE, AL, AM, AT, AT (Ge-</b> <b>brauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,</b> <b>CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DE (Gebrauchsmuster), DK,</b> <b>DK (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,</b> <b>GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,</b> <b>LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW,</b> <b>MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,</b> <b>TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW,</b> <b>ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ,</b> <b>UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,</b> <b>RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE,</b> <b>DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE),</b> <b>OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW,</b> <b>ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b>  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu</i> <i>veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: <b>PHARMACEUTICALLY ACTIVE COMPOSITION AND DISPENSING DEVICE</b>  (54) Bezeichnung: <b>ZUSAMMENSETZUNG EINER PHARMAZEUTISCH WIRKSAMEN SUBSTANZ UND ABGABEEINRICHTUNG</b>  (57) Abstract  The present invention relates to an improved pharmaceutical substance in addition to an improved dispensing device that allows for more effective nasal administration of a substance.  (57) Zusammenfassung  Die vorliegende Erfindung betrifft eine verbesserte pharmazeutische Substanz sowie eine verbesserte Abgabeeinrichtung, die zum wirksameren nasalen Applizieren einer Substanz ausgebildet ist.		

BEST AVAILABLE COPY

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

10

15

**Zusammensetzung einer pharmazeutisch wirksamen Substanz  
und Abgabeeinrichtung**

20

Die Anmeldung zitiert verschiedene Druckschriften. Der Inhalt dieser Druckschriften ist durch Bezugnehmen in die Anmeldung inkorporiert.

25 Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen einer pharmazeutisch wirksamen Substanz, insbesondere Antigene, die mit einem mukosalen Adjuvans vermischt sind und mit einer als Sprayapplikator ausgebildeten Abgabeeinrichtung so auf die Nasenschleimhaut gebracht werden können, daß eine bisher noch nie erzielte Wirksamkeit erreicht werden kann.

30

Insbesondere umfaßt die Anmeldung eine Vakzine zur intranasalen Applikation, bestehend aus:

- 2 -

- (a) Influenzaoberflächenproteinen, welche liposomal formuliert sind (Virosomen);
- (b) mukosalem Adjuvans bakteriellen Ursprungs;
- (c) spezifischem Sprayapplikator, der so konstruiert ist, daß nahezu 100% des Spraystosses vollumfänglich auf die für die Wirksamkeit wichtige Nasenschleimhaut appliziert werden kann.

Die Antigene sind vorzugsweise Influenza-Oberflächenglykoproteine, die liposomal formuliert sind (sog. Virosomen). Diese Virosomen werden mit einem mukosalen Adjuvans gemischt, das bakteriellen Ursprungs ist. Idealerweise kommt es aus der Klasse der aktiven oder inaktiven Toxine, wie *Heat Labile Toxin* (HLT), Cholera toxin (CT) oder Procholeragenoid (PCG). Der nasale Sprayapplikator ist so konstruiert, daß die wirksame Substanz im wesentlichen vollumfänglich auf die Nasenschleimhaut appliziert werden kann. Die der Erfindung zugrundeliegende Formel kann für verschiedene medizinische Indikationen verwendet werden, wie Impfung gegen Grippe oder andere Infektionskrankheiten sowie zur therapeutischen Behandlung von verstopfter Nase, Rekonstitution von lädierter Nasenschleimhaut oder allgemein mukosal lokalisierten Krankheiten.

Verschiedene Autoren haben die immunstimulierende Wirkung von Liposomen (künstlichen Membranen) beschrieben (Gregoriadis, G.: Immunological adjuvants: A role for liposomes. *Immunol. Today* 11 (1990) 89-97). Diese immunstimulierende Wirkung wird erzielt, wenn die Antigene auf die Oberfläche der Liposomen gekoppelt werden (Glück R, Mischler R, Finkel B, Que JU, Scarpa B, Cryz SJ Jr: Immunogenicity of new virosome influenza vaccine in the elderly people. *Lancet* 344 (1994) 160-163), im Innern der Liposomen eingeschlossen werden (Gregoriadis G, Davis D, Davis A: Liposomes as immunological adjuvants: Antigen incorporation studies. *Vaccine* 5 (1987) 145-151) oder nur mit Liposomen vermischt werden (De Haan A, Geerligs HJ, Huckshorn JP, Van Scharrenburg GJM, Palache AM, Wilschut J: Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. *Vaccine* 13 (1995)

613-616). Eine zusätzliche immunstimulierende Wirkung wurde beobachtet, wenn solche Liposomen mit transmembranen und fusogenen Glykoproteinen „gespiked“ wurden (z. B. Influenzaglykoproteine (Glück, R., Mischler, R., Brantschen, S., Just, M., Althaus, B., Cryz, S. J., Jr.: Immunopotentiating reconstituted influenza virosome (IRIV) vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. J. Clin. Invest. 90 (1992) 2491-2495) oder Sendaiglykoproteine (Gould-Fogerite, S., Mazurkiewicz, J. E., Bhisitkul, D., Mannino, R. J.: The reconstitution of biologically active glycoproteins into large liposomes. Use as a delivery vehicle to animal cells. In: C. H. Kim, J. Diwan, H. Tedeschi und J. J. Salerno (Hrsg.), Advances in Membrane Biochemistry and Bioenergetics, Plenum Publishing Corp., New York (1987) S. 569).

Bisher wurde jedoch diese Wirkung meistens nach parenteraler Applikation (i.m., s.c. oder i.p.) beschrieben. Einige Autoren fanden jedoch, daß solche Formulierungen mit herkömmlichen Methoden (Tropfer oder herkömmliche Nasensprays) erfolgreich verabreicht werden können. Die Ergebnisse beziehen sich jedoch fast ausschließlich auf Experimente mit Labortieren, meist die Maus, welche im Vergleich zum Körpergewicht eine viel größere Nasenschleimhaut besitzt als vergleichsweise der Mensch. Zudem war die verabreichte Antigenmenge so hoch, daß alleine aus wirtschaftlichen sowie Gründen der Produktsicherheit eine Anwendung beim Menschen nicht in Frage käme. Auch konnte gezeigt werden, daß bei einer vernünftigen Dosierung des Antigens (Influenza) trotz liposomaler Formulierung und richtiger nasaler Applikation keine befriedigende Wirkung erzielt werden konnte.

25

Andere Autoren versuchten deshalb, eine wirksame nasal applizierbare Vakzine zu entwickeln, indem sie anstatt der liposomalen Formulierung die Antigene mit einem mukosalen Adjuvans bakteriellen Ursprungs vermischten. Dabei wurden insbesondere HLT, CT oder nicht toxische Derivate von HLT oder CT (Eison CO, Ealiding W: Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. J. Immunol. 132 (1984) 2736-2741) verwendet.

30

- Die Ergebnisse in der Literatur zeigten in der Tat vielversprechende Wirkungen nach nasaler Applikation, welche erneut vor allem in Labortieren erzielt worden waren. Jedoch einige wenige klinische Versuche im Menschen bestätigten eine gewisse Wirksamkeit (Tamura S-J, Ishihira K, Miyata K, Aizawa C, Kurata T: Mechanism of enhancement of the immune responses to influenza vaccine with cholera toxin B subunit and a trace amount of holotoxin. Vaccine 13 (1995) 339-341). Doch erneut war die zu verwendende Antigen- und Adjuvansmenge sehr hoch, was wiederum Vorbehalte betreffend Produktsicherheit und Möglichkeit der Kommerzialisierung offenließ.
- 10 Weitere Nachteile der bisher beschriebenen Versuche zur Entwicklung einer nasal applizierbaren, präventiv oder therapeutisch wirksamen Vakzine sind die heute zur Verfügung stehenden ungenügenden Applikatorsysteme.
- 15 Zur Zeit gibt es Nasensprays als Mono-, Bi- und Multidosis-Applikatoren. Eingehende Untersuchungen und Prüfungen der bisherigen Nasensprays mittels Farbstoffapplikation (Methylenblau) und Nasenendoskopie haben ergeben, daß die zu versprühende Substanz (Vakzine, pharmazeutische Lösung) nur höchstens zu 25% an die Schleimhaut des Mukosa-assoziierten Immunsystems der Turbinalien
- 20 gelangt.
- Die Schleimhaut des Mukosa-assoziierten Immunsystems befindet sich in der Nasenhöhle an der lateralen Nasenwand in Bereich der Turbinalien (Nasenmuscheln), wie beispielsweise Figur 1 zeigt, die humane Turbinalien und
- 25 Turbinalien eines Rehs darstellt. Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß mit den bisherigen Nasensprays wegen erheblicher Verluste im Nasenvorhof (Vestibulum nasi) (siehe Figur 2) sowie an der Nasenscheidewand nur eine ungenügende Menge der pharmazeutisch aktiven Substanz in die Nasenhaupthöhlen gelangt. Diese Nasenstrukturen sind mit immunologisch
- 30 inaktivem Plattenepithel und Talgdrüsen ausgekleidet. (Walter Becker, Hans Heinz Naumann, Carl Rudolf Pfaltz: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1992).

Ursachen für das Unvermögen bisheriger Nasenapplikatoren, eine suffiziente Dosis auf die respiratorische Schleimhaut (Ort der spezifischen und unspezifischen Abwehr) zu versprühen, sind verschiedener Art:

- 5 (1) Aufgrund ungenügender Anatomiekenntnisse wird der Hauptvektor des Sprühstrahls bei der Sprayapplikation in eine falsche Richtung gelenkt. Dabei gelangt die pharmazeutisch aktive Substanz kaum in die Nasenhaupthöhle. Die versprühte Flüssigkeit fließt teilweise über die Oberlippe nach unten heraus.
- 10 (2) Der Sprühansatz beim Nasenteil ist in seinem Durchmesser nicht den anatomischen Verhältnissen angepaßt. Das innere Nasenloch ist natürlicherweise spaltförmig und hat die Funktion einer Düse (siehe Figur 2). Die üblicherweise breiten Nasenstücke vermögen diese anatomische Enge nicht zu überwinden. Beim Versprühen vor dem Lumen nasi gelangt nur  
15 derjenige Sektor des Sprühkegels in die Nasenhaupthöhle, der der Breite des Lumen nasi entspricht.
- (3) Der optimale Sprühwinkel wurde bisher noch nicht wissenschaftlich ausgelotet. Bei den herkömmlichen Sprayapplikatoren variiert dieser willkürlich zwischen 30° und 80° zur Horizontalen bei normal gehaltenem Kopf bzw. zu einer  
20 Senkrechten zur Längsachse des Körpers eines Menschen. Damit sind erhebliche Verluste, nämlich bis 90% des applizierten Volumens ebenfalls erklärlich. Unsere systematischen Untersuchungen haben gezeigt, daß der optimale Sprühwinkel zwischen 50° und 80° liegt.
- (4) Herkömmliche Nasensprays haben ein zu kurzes Nasenstück. Die Distanz von  
25 der Fingermanschette bis zur Sprühöffnung ist zu kurz. Man gelangt mit den bisherigen Sprays nicht einmal bis zum inneren Nasenloch. Das Nasenstück sollte mindestens 0.7 cm länger sein, besonders bevorzugt weist das Nasenstück eine Länge von 1 bis 1.5 cm auf.
- 30 Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine verbesserte Zusammensetzung einer pharmazeutisch wirksamen Substanz sowie eine verbesserte Abgabeeinrichtung, insbesondere zur Prävention und Behandlung von

Infektionskrankheiten bereitzustellen. Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen der Patentansprüche gelöst.

Die wirksamste Zusammensetzung für die präventive und therapeutische Wirkung besteht aus der Formel des überraschend kostimulierenden Effektes von Liposomen, gemischt mit einem mukosalen Adjuvans und appliziert mit einer neuen Abgabeeinrichtung bzw. einem neuen Nasenspray.

Dementsprechend besteht der Erfindungskomplex aus folgenden Komponenten:

- 10 (a) einer aktiven Substanz (Antigen);
  - (b) einer ausgewogenen Mischung von Liposomen und mukosalem Adjuvans; und
  - (c) einem neuen medizinischen Gerät, nämlich einer spezifischen Abgabeeinrichtung bzw. Nasenspray.
- 15 Insbesondere betrifft die Erfindung Vakzine zur intranasalen Applikation, bestehend aus:
- (a) Influenzaoberflächenproteinen, welche liposomal formuliert sind (Virosomen);
  - (b) mukosalem Adjuvans bakteriellen Ursprungs; und
  - 20 (c) spezifischem Sprayapplikator, der so konstruiert ist, daß nahezu 100% des Spraystosses vollumfänglich auf die für die Wirksamkeit wichtige Nasenschleimhaut appliziert werden kann.

Die aktive Substanz bezieht sich daher auf Antigene, insbesondere auf Influenzaglykoproteine, welche wegen ihrer transmembranen Domänen leicht in künstliche Membranen (Liposomen) eingebaut werden können. Es können jedoch leicht noch weitere Antigene allein oder in Kombination mit den Influenzaantigenen auf die Oberfläche der Liposomen gekoppelt werden. Die Koppelung geschieht je nach chemischer Beschaffenheit der Antigene spontan oder mittels eines chemischen Crosslinkermoleküls, wie dies schon früher beschrieben worden war

30 (Martin FJ, Papahadiopoulos D: Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. J. Biol. Chem. 257 (1982) 286-288). Es kann sich auch um



ein DNS-Plasmid oder ein RNS-Plasmid handeln, welches für ein Antigen kodiert und in die Liposomen eingeschlossen werden kann.

Der Begriff "Antigen" in Sinne dieser Erfindung umfaßt sowohl vollständige Moleküle als auch Fragmente dieser Moleküle, die antigene Eigenschaften haben und/oder zur Immunisierung eingesetzt werden können. Weiterhin umfaßt der Begriff "Antigen" Moleküle und/oder Fragmente von Molekülen, die immunstimulierend sind.

10 Das in der erfindungsgemäßen Vakzine eingesetzte Influenzaoberflächenprotein umfaßt vorzugsweise Hämagglutinin (HA). Weiterhin kann das Influenzaoberflächenprotein Hämagglutinin (HA) in Verbindung/Kombination mit Neuraminidase (NA) umfassen.

15 In einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Vakzine, welche weitere Antigene enthält. Insbesondere können die weiteren Antigene an der Oberfläche der Virosomen gebunden sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Anmeldung  
20 erfindungsgemäße Vakzine, die neben den Antigenen bestehend aus Influenzaoberflächenprotein(en) weitere Antigene, vorzugsweise von pathogenen Organismen enthalten. Hierbei kann der pathogene Organismus ein Virus, ein Bakterium, ein Pilz oder ein Parasit sein. Diese Organismen umfassen verschiedene Krankheitserreger wie, z.B.: Hepatitis A-Virus, Hepatitis B-Virus,  
25 respiratorisches Syncytial-Virus (Pneumovirus), Parainfluenzavirus, Mumpsvirus, Mobillivirus, HIV, Diphterie-Bakterium (Corynebacterium diphtheriae), Tetanusbazillus (Clostridium tetani), Pneumokokken, Haemophilus influenzae, E. Coli, Candida albicans, Candida tropicalis, Candida pseudotropicalis, Candida parapsilosis, Candida krusei, Aspergillus-Arten, Trichomonas-Arten, Trypanosoma-  
30 Arten, Leishmania-Arten, Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Trematoden-Arten und Nematoden-Arten. Insbesondere umfassen die Trematoden-Arten Schistoma

haematobium, *S. mansoni*, *S. japonicum* und die Nematoden-Arten *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides* und *Trichinella spiralis*.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Vakzine, welche ein Influenzavakzine ist.  
5 Insbesondere umfaßt die Erfindung eine Vakzine, welche zur Prävention und/oder Behandlung allgemeiner Infektionen/Infektionserkrankungen angewandt werden kann. Weiterhin dient die Vakzine zur Prävention und/oder Behandlung von Influenzaerkrankungen, zur Prävention und/oder Behandlung von verstopfter Nase, zur Behandlung von Verletzungen von Nasenschleimhäuten. Weiterhin umfaßt die  
10 Erfindung vorzugsweise Vakzine, wobei der Hämagglutinin-Gehalt pro Dosis (100 µl) zwischen 1 - 30 µg, mit Vorteil zwischen 3 - 10 µg und am besten bei 3.75 µg liegt.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die Erfindung auf eine Vakzine, wobei  
15 das Verhältnis Liposomen-Phospholipid zu HA zwischen 1:10 und 20:1, vorzugsweise zwischen 1:1 bis 10:1 und besonders bevorzugt bei 3:1 liegt.

Desweiteren bezieht sich die Erfindung vorzugsweise auf eine Vakzine, wobei das Phospholipid der Liposomen ausgewählt ist aus der Gruppe von neutralen,  
20 kationischen und/oder anionischen Phospholipiden.

In einer bevorzugten Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf eine Vakzine, bei der das mukosale Adjuvans ein aktives Toxin, ein inaktives Toxin und/oder ein nicht-toxisches Toxin ist. Insbesondere umfaßt das mukosale Adjuvans,  
25 vorzugsweise, *Heat Labile Toxin* (HTL), *Choleratoxin* (CT) und/oder *Procholeragenoid* (PCG). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das mukosale Adjuvans das *Heat Labile Toxin* (HLT) von *Escherichia coli*. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die Toxine inaktiviert sein. Diese Inaktivierung kann durch Rekombinationstechnologie erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung eine Vakzine, welche *Heat Labile Toxin* (HLT) und/oder Choleratoxin (CT) in einem Verhältnis enthält, das zwischen 1:2 bis 20:1, besser zwischen 1:1 und 1:10, und am besten bei 7,5:1 liegt.

- 5 Der oben verwendete Begriff "ausgewogene Mischung aus Liposomen und mukosalem Adjuvans" bezieht sich einerseits auf das richtige Verhältnis von Antigen und Phospholipiden sowie mukosalem Adjuvans, das nötig ist für eine zufriedenstellende Wirksamkeit. Klinische Untersuchungen haben folgendes gezeigt: Das ideale Verhältnis Phospholipid (z. B. Phosphatidylcholin, 10 Phosphatidylethanolamin, neutrale, anionische oder kationische Phospholipide) zu Influenza-Antigen liegt zwischen 1:1 bis 20:1. Am idealsten liegt es bei 3:1. Das Verhältnis Influenza-Antigen zum aktiven mukosalen Adjuvans (Toxin) HLT oder CT liegt zwischen 1:2 bis 20:1. Das vorteilhafteste Verhältnis liegt bei 7,5:1.
- 15 Wie oben erwähnt liegt das Verhältnis Influenza-Antigen zum inaktiven mukosalen Adjuvans (inaktives Toxin) PCG oder nicht toxischen Derivat von HLT und CT zwischen 3:1 und 1:20, idealerweise bei 1:2.

- In vitro-Experimente zur Messung der immunstimulierenden mukosalen Wirkung 20 haben überraschenderweise gezeigt, daß eine Mischung der Adjuvantien Liposomen und mukosales Adjuvans nicht eine Addition der Wirkungen bewirkt, sondern daß die Addition um einen Faktor von mindestens fünf erhöht wird.

- Der Begriff "neues medizinisches Gerät" bezieht sich auf einen Spray-Applikator, 25 der sich besonders für die intranasale Immunisierung (Vakzination) eignet. Es genügt nicht, eine mukosal wirksame Substanz zusammenzustellen, wenn die Applikation schlecht oder ungenügend ist.

- Das neue Gerät zeichnet sich dadurch aus, daß es die anatomischen 30 Gegebenheiten der Nase vollständig berücksichtigt:
- (1) Die Distanz von Fingermanschetten bis Sprühkopf beträgt vorzugsweise mindestens 4,0 cm.

- (2) Der vordere Teil des Nasenstücks besteht aus einem im wesentlichen zylindrischen Aufsatz, der beispielsweise mindestens 5 mm lang und höchstens 5 mm im Durchmesser ist.
- (3) Der Sprühwinkel der in dieser Erfindung beschriebenen Abgabeeinrichtung beträgt vorzugsweise 50° bis 70° zur Horizontalen.
- (4) Die Achse der Hauptrichtung des Abgabeeinrichtung bzw. des Sprayapplikators wird vorzugsweise durch eine spezielle Manschette bestimmt: Die Manschette ist vorzugsweise auf das Vorderteil des Nasenstücks der Abgabeeinrichtung aufsteckbar und derart ausgebildet, daß sie bei der nasalen Sprayapplikation auf der Oberlippe abgestützt werden kann, so daß die Sprührichtung im wesentlichen zur lateralen Wand der Nasenhöhle zielt.

Eine Ausbildung der Manschette zur Abstützung auf der Oberlippe ist bevorzugt, da die Oberlippe relativ nahe an der Nase liegt und dennoch die Distanz groß genug ist, um einen wirksamen Hebel zur vorteilhaften Ausrichtung zu bilden. Außerdem ermöglichen die sensiblen Tastsensoren der Lippe dem Benutzer, die richtige (zentrische bzw. parallele) Auflage der Manschette, ohne einen Blick in den Spiegel zu überprüfen. Daneben kann die Manschette jedoch auch zur Abstützung an anderen Körper- bzw. Kopfpunkten ausgebildet zu sein.

Das schmale Nasenstück hat vorzugsweise eine Mindestlänge von 0.5 cm, besser 1 cm, und das nachfolgende dickere Nasenstück ist bevorzugt mindestens 1 cm, mit Vorteil 2 cm, lang. Die Distanz zwischen dorsaler Fingeroberfläche und Sprayspitze sollte mindestens 2 cm, mit Vorteil 2,5 bis 3 cm, betragen bzw. die Distanz von Fingerabsatz (Manschette) bis Sprayspitze sollte mindestens 3 cm, mit Vorteil 4 bis 5 cm betragen. Der Sprühwinkel des Sprays sollte vorzugsweise 50° bis 70° zur Horizontalen betragen, wenn der Kopf in einer normalen senkrechten Position gehalten wird.

Zudem sollte der Hauptvektor des Sprühstoßes zwischen mittlerer und unterer Nasenmuschel gerichtet sein. D.h., er soll auf den mittleren Nasengang gerichtet sein. Dies setzt in der Regel eine beinahe horizontale Richtung des Applikators

voraus. Eine solche kann, wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben, durch das Anbringen einer speziellen Applikator-Manschette fixiert werden. Es ist auch möglich, die Manschette und den Applikator einstückig oder integral auszubilden. In diesem Fall ist die Befestigungseinrichtung/Verbindungseinrichtung fest mit dem  
5 Applikator verbunden oder einstückig mit ihm ausgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich beim Sprayapplikator um einen Apparat, dessen Nasenstück mit Sprühkopf vorzugsweise höchstens 5 mm dick und mindestens 5 mm, besser 7 mm, lang ist, dessen Distanz zwischen  
10 Fingermanschette bis Sprühkopfspitze mindestens 3 cm beträgt und der mit einer montierbaren Manschette das Einführen in das Nasenloch so erlaubt, daß der Hauptsektor des Nasensprays mit der Horizontalen einen Winkel von ca. 15 bis 20° bildet.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Gemisch aus Influenza-Oberflächenantigenen, das an der Oberfläche von Liposomen präsentiert wird. Dieses Mittel kann mit Antigenen von anderen pathogenen Mikroorganismen kombiniert werden. Wie oben bereits erwähnt kann die erfindungsgemäße Vakzine daher weitere Antigene, vorzugsweise Antigene anderer pathogener Organismen  
20 enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform dient das vorstehend beschriebene Verfahren zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten, zur Behandlung einer verstopften Nase und verschiedener Störungen der Nasenschleimhaut.  
25

Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beispielhaft beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 eine Vergleichsdarstellung zwischen humanen Turbinalien und Turbinalien eines Rehs;  
30

Fig. 2 eine schematische Darstellung des anatomischen Baus eines inneren Nasenlochs;

- Fig. 3 eine schematische Darstellung des prinzipiellen Aufbaus einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Abgabeeinrichtung;
- Fig. 4 eine Darstellung des korrekten Sprühwinkels bei wirksamer Applikation;
- Fig. 5 eine Darstellung einer Nasenzytologie: Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen, die durch Nasenabstrichtechnik von den Individuen (20 jeder Gruppe) bis zu 29 Tage nach drei verschiedenen Arten der intranasalen Vakzination erhalten wurden. Man beachte den deutlichen Anstieg der Centroblasten als Anzeichen einer lokalen Immunantwort in Gruppe A im Gegensatz zum signifikant geringeren Anstieg in den Gruppen B und C ( $p < 0,005$ );
- Fig. 6 eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Abgabeeinrichtung ohne Manschette; und
- Fig. 7a und 7b zwei Ansichten einer bevorzugten Ausführungsform einer Manschette für die erfindungsgemäße Abgabeeinrichtung von Fig. 6.

15

### BEISPIEL 1

Herstellung einer mukosalen virosomalen Influenzavirusvakzine mit HLT  
als zusätzlichem mukosalen Adjuvans

- Die Herstellung einer Influenzavirosomenvakzine ist beschrieben in Glück R, Wegmann A: Liposomal presentation of influenza antigens. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, Hrsg., Textbook of Influenza (1998). S. 400-409. London: Blackwell. In Kürze umfaßt die Herstellung: Die Stämme H1N1 A/Singapur/6/86, H3N2 A/Wuhan/359/95 und B/Beijing/184/93 des Influenzavirus, die in angebrüteten Hühnereiern kultiviert wurden, wurden vom National Institute of Biological Standards and Control, London, GB, geliefert. Intakte Virionen wurden aus der Chorioallantois-Flüssigkeit durch Zonenzentrifugation isoliert und mit  $\beta$ -Propiolacton inaktiviert. Gereinigte Virionen wurden in einen Puffer gegeben, der 0,1 M Octaethylenglycolmono(N-dodecyl)ether (OEG) (Nikko Chemicals, Japan) in PBS-NaCl enthielt. Diese wurden 20 Minuten bei 21°C inkubiert, um die vollständige Zersetzung der Viruskomponenten zu ermöglichen.

Zur Extraktion von Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) wurde das Gemisch 60 Minuten bei 100000xg zentrifugiert. Der Überstand, der HA, NA und virale Phospholipide (PL) enthielt, wurde zur Herstellung der verschiedenen intranasalen Vakzinformulierungen verwendet. Zusätzliche Phospholipide (Phosphatidylcholin [Lipoid, Deutschland]) wurden zugegeben und löslich gemacht. Die Virosomen wurden spontan während der Entfernung des OEG-Detergens durch Chromatographie gebildet. Zu einer mukosalen Vakzindosis (100 µl), die 3,75 µg HA von jedem von drei Influenzavirusstämmen, wie von der WHO empfohlen, und 35 µg Lecithin enthielt, wurden 0,5 µg *Heat Labile Toxin* (HLT) von E. coli aus dem Produktionsstamm E. coli HE22VK (Vogel FR, Powell MF: A compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (M. F. Powell, M. J. Newmann, Hrsg.), Plenum Press, New York (1995) S. 141) als mukosales Adjuvans gegeben.

## 15 Beispiel 2

Die E.coli-Zellen werden in einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia AG) sedimentiert und in "Phosphate buffered saline" (PBS, 6.06 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.46 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L NaCl pH 7.4) suspendiert.

20 Die Freisetzung des intrazellulären hitze-labilen Toxins (HLT) erfolgt durch Zellaufschluß in einer Kugelmühle (z.B. Dyna-Mill, W.Bachofen AG) oder in einer French-Press. Zum Beispiel: 10 L Zellsuspension wird mit einer Flußrate von 33 mL/min. durch die Kugelmühle gepumpt. Die Kugelmühle ist mit 500 mL Glaskugeln gefüllt, rotiert mit 3000 min<sup>-1</sup> und die Schlitzöffnung beträgt 0.05 mm.

Die Abtrennung fester Zellbestandteile in der Zellaufschluß-Lösung erfolgt mittels tangentialer Mikrofiltration. Zum Beispiel: Die 10 L -Zell-Lysat werden in einem ProstaK-System (Millipore AG) unter Verwendung eines Filters mit 0.2 µ Porengröße auf ca. 4 L eingeeengt. Danach wird mit 24 L PBS nachgespült. Das Permeat wird durch einen 0.2 µ-Sterilfilter (z.B. Gelman Supor DCF, Pall) filtriert.

- 14 -

Aus dem Permeat wird das HLT mittels Affinitäts-Chromatographie isoliert. Als stationäre Phase wird immobilisierte Galaktose (Galaktose-Gel z.B. von Pierce) oder immobilisierte Laktose (Laktosyl-Gel z.B. Pharmacia) verwendet. Die mobile Phase besteht aus PBS (Puffer A) und 5% (g/v) Laktose in halb konzentriertem PBS (Puffer B). Zum Beispiel: Das sterilfiltrierte Zell-Lysat wird auf die mit Puffer A  
5   vorkonditionierte Säule aufgetragen und die Säule danach mit Puffer A gespült, bis die UV-Absorption bei 280 nm die Basislinie erreicht. Danach wird das HLT mit Puffer B von der Säule eluiert.

10

### BEISPIEL 3

Herstellung einer mukosalen virosomalen Influenzavakzine mit PCG  
als zusätzlichem mukosalen Adjuvans

Die Herstellung einer Influenzavirosomvakzine ist im Beispiel 1 beschrieben. Zu  
15   einer mukosalen Vakzindosis (100 µl), die 3,75 µg HA von jedem von drei Influenzavakzinstämmen, wie von der WHO empfohlen, und 35 µg Lecithin enthielt, wurden 6 µg Procholeragenoid, hergestellt durch Erhitzen von gereinigtem CT, das aus *V. cholerae* (Inaba 569B) stammte, als mukosales Adjuvans gegeben (Pierce  
NF, Cray WC, Sacci JB, Craig JP, Germanier R, Fürer E: Procholeragenoid: A safe  
20   and effective antigen for oral immunization against experimental cholera. Inf. Immunity 40, 3 (1983) 1112-1118).

### BEISPIEL 4

Herstellung einer mukosalen Hepatitis-B-(HBs-)Vakzine

25

Phosphatidylethanolamin (R. Berchtold, Biochemisches Labor, Bern, Schweiz) wurde in Methanol gelöst, und 0,1% (Vol./Vol.) Triethylamin wurde zugegeben. Die Lösung wurde dann mit  $\gamma$ -Maleimidobuttersäure-N-hydroxysuccinimidester (GMBS) (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) (Verhältnis  
30   Phosphatidylethanolamin:GMBS = 2:1) gemischt, das zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst worden war. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungsmittel 1 Stunde unter Vakuum in einer Speedvac-Zentrifuge



- 15 -

verdampft. Rekombinante HBs-Partikel wurden gemäß bekannter Verfahren in CHO-Zelllinien hergestellt und gereinigt.

- Um ein reduziertes HBs-Partikel mit freien Cysteinresten zu erhalten, wurden die
- 5 Partikel mit 40 mMol/l DL-Dithiothreitol (DTT) für 5 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Das DTT wurde unter Verwendung einer Sephadex-G10-Säule (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden) entfernt, und Octaethylenglycol (Fluka Chemicals, Schweiz) (OEG) wurde in einer Endkonzentration von 100 mMol/l zugegeben. Das verdampfte
- 10 Phosphatidylethanolamin-GMBS wurde dann mit der HBs-Lösung 1 Stunde gemischt (Verhältnis HBs:GMBS = 1:2), ungebundenes GMBS wurde dann durch Cystein abgefangen. Die Umsetzungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie überwacht.
- 15 32 mg Phosphatidylcholin (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) und 6 mg Phosphatidylethanolamin wurden zu den zuvor vernetzten Phosphatidylethanolamin-GMBS-HBs gegeben, und dieses Gemisch wurde in einem Gesamtvolumen von 2,66 ml PBS, die 100 mM OEG enthielt (PBS-OEG), gelöst.
- 20 Das Influenza A/Singapur-Hämagglutinin wurde gereinigt, wie vorstehend im Beispiel (1) beschrieben. Eine Lösung, die 4 mg Hämagglutinin enthielt, wurde 30 Minuten bei 100000g zentrifugiert, und das Sediment wurde in 1,33 ml PBS-OEG gelöst.
- 25 Die Phospholipide und die Hämagglutininlösung wurden gemischt und 1 Minute mit Ultraschall behandelt. Das Gemisch wurde dann 1 Stunde bei 100000g zentrifugiert und der Überstand steriltriftriert (0,22 µm).
- 30 Virosomen mit adsorbiertem HBs wurden dann durch Entfernung des Detergens unter Verwendung von BioRad-SM-Bio-Beads gemäß Beispiel 1 entfernt. Einer

Stammlösung enthaltend 50 µg HBs-Antigen/ml wurde 10 µg/ml HLT aus Beispiel 2 zugegeben und in Sprayapplikatoren gemäß Beispiel 6 abgefüllt.

### BEISPIEL 5

#### 5 In-vitro-Test zum Testen der Aktivität des mukosalen Adjuvans

Die biologischen Aktivitäten der mukosalen Adjuvantien wurden mit Influenzavirosomen, HLT, PCG, einem Gemisch von Virosomen und HLT gemäß Beispiel 1 und einem Gemisch von Virosomen und PCG gemäß Beispiel (2) gemessen. Die nachstehenden Lösungen wurden zu Y-1-Nebennierenzellen ATCC: CCL 79 (Y-1-adrenal tumor, mouse steroid secreting) in Minikultur gemäß Sack DA und Sack RB (Sack DA und Sack RB: Test for enterotoxigenic Escherichia coli using Y-1 adrenal cells in miniculture. Infect. Immun. 11 (1974) 334-336) gegeben:

15 (a) HLT (5 µg/ml), (b) PCG (60 µg/ml), (c) Influenzavirosomen und HLT: 37 µg/ml Influenzahämagglutinin von jeweils 3 Stämmen (H1N1, H3N2, B), 100 µg/ml Phosphatidylcholin und 5 µg/ml sowie (d) Influenzavirosomen und PCG: 37 µg/ml Influenzahämagglutinin von jeweils 3 Stämmen, 100 µg/ml Phosphatidylcholin und 60 mg/ml PCG.

20

Die nachstehenden Adjuvansaktivitäten (in Einheiten) wurden bestimmt:

(a) 15 Einheiten, (b) 6 Einheiten, (c) 80 Einheiten, (d) 36 Einheiten. Die höchste biologische Adjuvansaktivität wurde mit dem Gemisch aus Virosomen und HLT oder Virosomen und PCG durchgeführt. Die Adjuvanswirkung wurde mittels Zelltoxizitätsparametern bestimmt.

25

### BEISPIEL 6

#### Klinische Bewertung verschiedener Sprayapplikatoren

30 Die erfindungsgemäße Abgabeeinrichtung ist in ihrem Grundaufbau im wesentlichen mit herkömmlichen Sprayapplikatoren vergleichbar, ist jedoch besonders gut an die anatomischen Gegebenheiten für eine nasale Applikation

einer beliebigen, insbesondere jedoch der hierin beschriebenen pharmazeutisch wirksamen Substanzen, angepaßt.

5 Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Abgabeeinrichtung 2 ist in den Figuren 3 und 6 gezeigt. In der in Figur 3 dargestellten Seitenansicht der erfindungsgemäßen Abgabeeinrichtung (Sprayapplikator) 2 sind die wesentlichen Komponenten erkennbar. Die Abgabeeinrichtung 2 weist im wesentlichen einen Behälter 4 mit einer (nicht dargestellten) pharmazeutisch wirksamen Substanz und einen Spray- bzw. Pumpmechanismus 6 auf. Der Pumpmechanismus 6 ist mit  
10 einem Verbindungsabschnitt 8 fluidicht mit dem Behälter 4 verbunden. Das Pumpen und Sprühen mit der erfindungsgemäßen Abgabeeinrichtung 2 erfolgt auf herkömmliche Weise durch Betätigung einer Fingermanschette 10. Die im Behälter 4 befindliche pharmazeutisch wirksame Substanz wird durch eine sich durch den Pumpmechanismus erstreckende Öffnung 12 an einer Austrittsöffnung 14  
15 abgegeben.

Die erfindungsgemäße Abgabeeinrichtung 2 unterscheidet sich von den bekannten Sprayapplikatoren insbesondere durch die konstruktive Ausgestaltung des Nasenstücks 16, das beim effektiven Applizieren der pharmazeutisch wirksamen  
20 Substanz eine wesentliche Rolle spielt. Das Nasenstück 16 ist vorzugsweise integral mit dem Pumpmechanismus 6 und der Fingermanschette 10 ausgebildet. Das Nasenstück 16 ist vorzugsweise in zwei Abschnitte 18 und 20 unterteilt, wobei der in Richtung der Fingermanschette 10 gelegene Abschnitt 18 einen größeren Durchmesser aufweist als der benachbart zur Austrittsöffnung 14 gelegene  
25 Abschnitt 20 des Nasenstücks 16. Der Übergangsbereich zwischen den beiden Abschnitten 16 und 20 bildet einen Anschlag 22 für eine - gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung - am Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 befestigbare Manschette 24 zur Abstützung an der Oberlippe eines Benutzers.

30 Der zur Austrittsöffnung 14 benachbart gelegene Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 ist vorzugsweise im wesentlichen zylindrisch ausgebildet und weist einen Durchmesser  $d_{20}$  von maximal 5 mm, bevorzugt etwa zwischen 2 und 4 mm auf. Die

- Länge  $l_{20}$  des vorderen Abschnitts 20 des Nasenstücks 16 beträgt beispielsweise mindestens 5 mm, bevorzugt mindestens 10 mm und besonders bevorzugt 10 bis 20 mm. Die Manschette 24 ist über den Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 vorzugsweise von der Austrittsöffnung 14 her aufschiebbar und bevorzugt mittels einer Verdrehsicherung drehfest auf der Abgabeeinrichtung 2 gehalten. Die Verdrehsicherung kann beispielsweise in Form eines Polygonprofils, z.B. mit elliptischem Querschnitt, am vorderen Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 und einer entsprechenden Aussparung 26 in der Manschette 24 realisiert sein.
- 10 Entsprechend einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Abgabeeinrichtung 2 kann der in die Nase eines Patienten ragende Abschnitt des Sprayapplikators auch an der Manschette 24 ausgebildet sein. Eine derartige Ausführungsform ist in Figur 7b beispielhaft dargestellt. Wie in Figur 7b gezeigt, ist an der Manschette 24 ein im wesentlichen rohrförmiger Absatz 28 ausgebildet, der auf den zur Austrittsöffnung 14 benachbart gelegenen Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 aufsetzbar ist. Die Abmessungen des rohrförmigen Abschnitts 28 entsprechen in diesem Fall bevorzugt im wesentlichen den Abmessungen ( $d_{20}$  und  $l_{20}$ ) der vorstehend beschriebenen Ausführungsform.
- 20 Der Abschnitt 18 des Nasenstücks 16 weist vorzugsweise eine Länge  $l_{18}$  von mindestens 10 mm und bevorzugt etwa 20 mm auf. Die Abmessungen der beiden Abschnitte 18 und 20 werden vorzugsweise so gewählt, daß die Distanz zwischen der dorsalen Fingeroberfläche eines Benutzers und der Sprayspitze bzw. Austrittsöffnung 14 mindestens 2 cm, vorteilhafterweise jedoch 2,5 bis 3 cm beträgt.
- 25 Dies ist insbesondere dann gewährleistet, wenn die Distanz zwischen der Manschette 24 bis zur Sprayspitze 14 mindestens 3 cm oder vorteilhafterweise 4 bis 5 cm beträgt.

- Durch die erfindungsgemäße Abgabeeinrichtung 2 mit diesen Abmessungen kann die pharmazeutisch wirksame Substanz wesentlich zielgenauer in die Nasenhaupthöhle bzw. in das innere Nasenloch gesprüht werden, so daß eine erheblich höhere Wirksamkeit als mit bekannten Systemen erzielbar ist.
- 30

Die erfindungsgemäße Abgabeeinrichtung 2 ist vorteilhafterweise mit der Manschette 24 versehen, so daß zusätzlich zu den günstigeren Abmessungen ein optimaler Sprühwinkel  $\alpha$  einstellbar ist. Die Manschette 24 ist jedoch auch  
5 unabhängig von dem vorstehend beschriebenen Sprayapplikator 2 an herkömmlichen Abgabeeinrichtungen vorsehbar, so daß auch mit diesen herkömmlichen Sprayapplikatoren aufgrund des genau einstellbaren Sprühwinkels  $\alpha$  eine erheblich verbesserte Wirksamkeit erzielt werden kann.

10 Die erfindungsgemäße Abgabeeinrichtung 2 kann folglich entweder durch die Wahl der Abmessungen des Nasenstücks 16 oder durch eine geeignete Manschette 24 zur Einstellung eines optimalen Sprühwinkels  $\alpha$  die verbesserte Wirksamkeit erzielen. Bevorzugt ist jedoch eine Kombination der neuartigen Abgabeeinrichtung 2 mit den vorstehend beschriebenen Abmessungen und der Manschette 24 zur  
15 Einstellung eines optimalen Sprühwinkels  $\alpha$  um bestmögliche Behandlungsergebnisse zu erzielen.

Die Manschette 24 wird wie bereits vorstehend kurz erläutert mit dem rohrförmigen Abschnitt 28 über den Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 geschoben. Im montierten  
20 Zustand ist die Manschette 24 vorzugsweise drehfest mit der Abgabeeinrichtung 2 verbunden. Beispielsweise kann die Verdrehsicherung durch ein an zumindest einer Seite abgeflachtes Kreisprofil am Nasenstück 16 sein, mit dem die Manschette 24 mittels einer entsprechend geformten Öffnung drehfest montierbar ist. Die Manschette 24 weist einen Abstützabschnitt 30 auf, der an der Oberlippe eines  
25 Benutzers anlegbar ist, um zusammen mit dem in das Nasenloch eines Patienten weisenden Abschnitt 20 des Nasenstücks 16 den Sprühwinkel  $\alpha$  definiert festzulegen. Der optimal Sprühwinkel  $\alpha$  liegt vorzugsweise zwischen 50° und 70°.

Der Abstützabschnitt 30 der Manschette 24 ist vorzugsweise korrespondierend zur  
30 Form der Oberlippe leicht gebogen, um eine optimale Anlage- und Abstützfläche bereitzustellen. Die Manschette 24 kann aus jedem geeigneten Material hergestellt sein, bevorzugt sind jedoch spritzgießbare Kunststoffmaterialien.

Zur Bewertung der Wirksamkeit wurden verschiedene Abgabeeinrichtungen getestet. Dazu wurde 1% Methylenblaulösung in fünf verschiedene Typen von nasalen Applikatoren eingefüllt:

- 5 (a) Ein Sprayapplikator gemäß dieser Erfindung mit Richtmanschette, welche die Richtung des Spraystoßes fixiert;
- (b) ein Sprayapplikator gemäß dieser Erfindung ohne Richtmanschette;
- (c) ein herkömmlicher kommerzieller Sprayapplikator ohne schmales Nasenstück von 2 cm Länge und 4 mm Durchmesser mit einem Sprühwinkel von 50°;
- 10 (d) ein Sprayapplikator gemäß dieser Erfindung, jedoch mit einem Sprühwinkel von 50°; und schließlich
- (e) ein Sprayapplikator gemäß dieser Erfindung, jedoch mit Fingermanschetten, die lediglich 3 cm vom Sprühkopf entfernt waren.

- 15    Sämtliche Sprayapplikatoren waren sog. Bidosis-Applikatoren. Jeder Sprayapplikator wurde von je 5 Versuchspersonen unter ärztlicher Aufsicht ausprobiert. Die Versuchspersonen spraysen je eine Dosis Methylenblaulösung in das eigene rechte und linke Nasenloch. Mittels Nasenendoskopie wurden die Mukosa-Turbinalien ausgeleuchtet und photographisch festgehalten. Die Intensität
- 20    der Blaufärbung sowie die blau gefärbte Fläche auf den Turbinalien wurden mittels einer Skala von 1 - 4 ausgewertet. Die Auswertung ergab folgendes Resultat (geometrisches Mittel):

- Gruppe (a): 19 Punkte, Gruppe (b): 16 Punkte, Gruppe (c): 7 Punkte, Gruppe (d): 9
- 25    Punkte, Gruppe (e): 12 Punkte.

- Nur in der Gruppe (a) wurde die Sprayflüssigkeit fast ausschließlich auf die Nasenschleimhaut appliziert. Auch in der Gruppe (b) wurde ein großer Teil des Sprayinhaltes auf die Schleimhaut gesprayt. In den übrigen Gruppen wurde ein
- 30    wichtiger Anteil des Sprayinhaltes in den Nasenvorhof gesprayt. Dort kann die zu applizierende Sprayflüssigkeit keine Wirksamkeit ausüben.

BEISPIEL 7

Vergleich der klinischen Wirksamkeit von intranasalen virosomalen  
Influenzavakzinen mit und ohne HLT; angewendet in einem neuen Spraygerät, das  
in der vorliegenden Erfindung beschrieben ist, in menschlichen Freiwilligen  
5 verglichen mit einer parenteralen kommerziellen Influenzavakzine

Die offene randomisierte klinische Studie wurden in völliger Übereinstimmung mit  
den Prinzipien der Erklärung von Helsinki und mit den örtlichen Gesetzen und  
Richtlinien bezüglich klinischer Studien durchgeführt. Nach der Genehmigung des  
10 Protokolls durch das Ethikkomitee des Kantons Luzern und der Bekanntgabe an  
die Schweizer Bundesgesundheitsbehörde gaben 80 gesunde Freiwillige (18-64  
Jahre alt) ihre schriftliche informierte Einwilligung zur Teilnahme. Freiwillige wurden  
ausgeschlossen, wenn sie Anzeichen für eine akute oder chronische Erkrankung  
zum Zeitpunkt der Immunisierung aufwiesen oder wenn eine gleichzeitige  
15 Behandlung mit immunsuppressiven Arzneimitteln oder eine bekannte  
Immunschwäche vorlagen.

Die intranasalen Vakzinformulierungen wurden an jede von drei Gruppen mit 20  
Freiwilligen verabreicht (Tabelle 1). Die Gruppen A und B erhielten 2 Dosen der  
20 Formulierung A bzw. B in jedes Nasenloch am Tag 1 und 2 Dosen eine Woche  
später. Die Gruppe C erhielt zwei Dosen doppelkonzentrierter Formulierung A am  
Tag 1. Die Gruppe D wurde intramuskulär im Deltoidbereich mit der parenteralen  
Formulierung geimpft. Blut- und Speichelproben (Omnisal®, GB) wurden  
unmittelbar vor der ersten Vakzination und einen Monat nach der ersten  
25 Immunisierung (Tag 29±2) abgenommen. Aufgrund eines technischen Problems  
konnten nur die Speichelproben der ersten 47 Personen bewertet werden. Die  
Bürstenzytologie der Nasenhöhle wurde vor der Immunisierung und an den Tagen  
4, 8 und 1 Monat nach der Erstimmunisierung durchgeführt.

30 Für die Analysen wurden die Blutproben und Speichelproben kodiert.

Die Serumimmunantwort auf die HA-Vakzinkomponente wurde durch einen Standardtest unter Verwendung von vier Hämagglutinineinheiten der entsprechenden Antigene bestimmt. Die Seren wurden vor dem Test 30 Minuten bei 56°C behandelt. Die Titer sind als reziproker Wert der höchsten Verdünnung des Serums ausgedrückt, die die Hämagglutination vollständig verhinderte. Ein Titer von  $\geq 1:40$  wurde als schützend angesehen.

Gesamt- und influenzaspezifische IgA-Antikörper wurden mittels bekannter ELISA-Verfahren bestimmt (Tamura SI, Ito Y, Asanuma H et al., Cross-protection against influenza virus infection afforded by trivalent inactivated vaccines inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. J. Immunol. 149 (1992) 981-987). Die virusspezifischen IgA-Werte wurden als ELISA-Einheiten von spezifischen IgA pro  $\mu\text{g}$  Gesamt-IgA-Konzentration ausgedrückt.

Die Nasenepithelzellen wurden ausschließlich von den Maxillo-Turbinaten beider Nasenhöhlen in jeder Person mit dem gleichen Typ einer kleinen Nylonbürste gesammelt, die bei zytopathologischen Untersuchungen während der Bronchoskopie eingesetzt wird (Glück U, Gebbers J-O, Nasal cytopathology in smokers: a possible biomarker of air-pollution? Am. J. Rhinol. 10 (1996) 55-57). Die Probennahme wurde durch den gleichen Untersucher (U. G.) unter rhinoskopischer Kontrolle mit einer rotierenden und translationalen Bewegung entlang der unteren Turbinatanheftung durchgeführt. Die Zellen wurden auf einen Glasobjektträger überführt und sofort in einer Lösung von 200 ml Ethanol + 100 ml Aceton + 6 Tropfen Trichloressigsäure fixiert.

25

Die Papanicolaou-gefärbten Objektträger wurden durch Pathologen untersucht, die am Institut für Pathologie in Cytopathologie, Kantonshospital Luzern, ausgebildet werden und nicht über den Vakzinationszustand informiert waren.

Die durchschnittlichen Zellzahlen von Flimmerzellen, Becherzellen, Lymphozyten, Centroblasten, Neutrophilen, Eosinophilen und Schuppenepithelzellen wurden in 25 repräsentativen Bereichen pro Objektträger bei 100x bestimmt.



Die Signifikanz zwischen den Grundlinien- und Postimmunisierungstitern wurde durch den Paired-T-Test bestimmt. Unterschiede in der Fähigkeit der 4 Vakzinationen, Anti-HA-Schutzantikörper in der Studiengruppe hervorzurufen, wurden durch  $\chi^2$  bestimmt.

Alle während der klinischen Studie beobachteten nachteiligen Ereignisse mußten aufgezeichnet werden. Ein nachteiliges Ereignis war definiert als eine nachteilige Änderung vom Grundlinien- (Vorvakzinations-) Zustand der Personen, ungeachtet dessen, ob das Ereignis als mit der Vakzination in Zusammenhang stehend betrachtet wird oder nicht. Nachteilige Ereignisse (lokale oder systemische Reaktion), die nach der Immunisierung auftraten, wurden durch den Kliniker auf einem speziellen Berichtsformular für nachteilige Ereignisse aufgezeichnet. Die Grundlinienrate der nachteiligen Ereignisse wurde vor der Immunisierung bestimmt.

80 Personen mit einem durchschnittlichen Alter von 40 Jahren und mit vergleichbarem sozialen Status wurden für die Studie rekrutiert. 27,5% der Teilnehmer waren weiblich. Alle 3 nasalen Vakzinationszubereitungen sowie die parenteralen Vakzine wurden gut vertragen. Anamnetisch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Nasenvakzinstoff-Gruppen, und alle 3 Formulierungen wurden gut vertragen. In einzelnen Fällen wurden die nachstehenden möglichen begleitenden Reaktionen berichtet: Fieber, Müdigkeit, Übelkeit, Rhinitis, verstopfte Nase und Rhinopharyngitis. Auch die parenterale virosomale Vakzine wurde äußerst gut vertragen.

Die serologische Immunantwort ist in der Tabelle 2 gezeigt. Signifikante Anstiege im Titer wurden in der Gruppe A (2 nasale Vakzinationen in 7 Tagen Abstand), Gruppe C (1 nasale Vakzination, doppelt dosiert) sowie in Gruppe D (parenterale Vakzination gegen alle 3 Virusstämme) gemessen. Die höchsten geometrischen Mittel der Antikörpertiter (GMT) wurden in den Gruppen A und D gefunden. Die Gruppe D hatte signifikant die höchsten GMT-Werte gegen den H1N1-Stamm

( $p \leq 0,05$ ). Im Fall des H3N2-Stamms gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen A und D.

- 5 Diese Gruppen reagierten signifikant besser als die Gruppen B und C. Beim B-Stamm gab es keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen A, C und D. Diese zeigten jedoch signifikant höhere Titer als Gruppe B. Die Serumkonversionsraten waren am höchsten in den Gruppen A und D. Gewöhnlich waren sie signifikant höher als die Raten in den Gruppen B und C und erfüllten für alle 3 Stämme die
- 10 Europäischen Anforderungen an parenterale Influenzavakzine gemäß der Europäischen Gemeinschaft (Kommission der Europäischen Gemeinschaft, Richtlinien für Medizinprodukte in der Europäischen Gemeinschaft. Harmonisierung der Anforderungen an Influenzavakzine. (1992) S. 93-98. Luxemburg: European Community Publication Office).
- 15 Die humorale mukosale Immunantwort (Speichel) ist in der Tabelle 3 gezeigt. Die höchsten Anstiege im IgA-Titer wurden in Gruppe A gemessen. Diese waren signifikant besser als in den anderen Gruppen. Unter Berücksichtigung des Gesamt-IgA waren die GMT in Gruppe A ebenfalls am höchsten. Die Mukokonversionsrate (vierfacher Anstieg im IgA-Titer) war wiederum deutlich am
- 20 höchsten in Gruppe A. Im Falle der intramuskulären Vakzination gab es nur sehr schwache Mukokonversionsraten.

- Die Bürstenzytologie der Nasenschleimhaut wurde in den Gruppen A, B und C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Figur 5 zusammengefaßt. Wir bestimmten die
- 25 Zellzahl des Nasenschleimhautepithels (Flimmer- und Nicht-Flimmer-Säulenzellen, Becherzellen und Schuppenepithelzellen) und der Zellen der Myelo/Mono- und Lymphopoese (Lymphozyten, Eosinophile, Neutrophile und Centroblasten). In Gruppe A konnte eine deutliche Becherzellhyperplasie am 4. und 8. Tag nach der ersten Vakzination nachgewiesen werden. Außerdem beobachteten wir einen
- 30 starken Anstieg an Lymphozyten und Centroblasten an den gleichen Tagen. Zusätzlich wurden ein Anstieg an Eosinophilen und Neutrophilen am 8. Tag nach

der anfänglichen Vakzination beobachtet. Die Anzahl der Säulenzellen blieb unverändert.

In Gruppe B gab es nur einen leichten Anstieg an Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Es gab kein Anzeichen für aktivierte Lymphozyten in dieser Gruppe.

In Gruppe C wurde eine sogar noch stärkere Becherzellhyperplasie festgestellt als in Gruppe A. Außerdem waren die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in dieser Gruppe am stärksten an den Tagen 4 und 8 angestiegen. Der Anstieg an Lymphoblasten war in dieser Gruppe schwächer als in Gruppe A.  $p = \leq 0,05$ . Einen Monat nach der ersten Vakzination war der vorherige Zustand der Zellzusammensetzung in allen Gruppen wiederhergestellt.

Fig. 5 betrifft die Nasenzytologie: Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen, die durch Nasenabstrichtechnik von den Individuen (20 jeder Gruppe) bis zu 29 Tage nach drei verschiedenen Arten der intranasalen Vakzination erhalten wurden. Man beachte den deutlichen Anstieg der Centroblasten als Anzeichen einer lokalen Immunantwort in Gruppe A im Gegensatz zum signifikant geringeren Anstieg in den Gruppen B und C ( $p < 0,005$ ).

#### BEISPIEL 8

Vergleich der klinischen Wirksamkeit von intranasalen virosomalen Influenzavakzinen mit HLT oder PCG in menschlichen Freiwilligen, verabreicht in einem neuen Spraygerät, das in der vorliegenden Erfindung beschrieben ist

Die Immunantwort und Tolerierbarkeit von zwei Anti-Influenzasprayvakzinen wurden in einer Doppelblindstudie untersucht, die mit insgesamt 158 gesunden Schweizer Freiwilligen im Alter von 18 bis 67 Jahren durchgeführt wurde.

Eine trivalente virosomale Influenzavakzine (gereinigtes HA, formuliert mit Phosphatidylcholin) wurde mit *Heat Labile Toxin* (HLT) von *E. coli* in einem Format

- kombiniert, das sich zur intranasalen Verabreichung eignet. Eine menschliche Dosis enthielt 7,5 µg HA von jedem Influenzastamm und 2 µg HLT. Eine Dosis wurde in jedes Nasenloch an den Tagen 1 und 8 an Gruppen von Individuen im Alter von 18-59 oder ≥60 Jahren verabreicht. Serumproben wurden etwa 4 Wochen nach der
- 5 Immunisierung entnommen. Reaktionen waren selten und schwach. Die Prozentsätze der Personen (Erwachsene bzw. Ältere), die schützende Serum-Anti-HA-Antikörpertiter erreichten (≥40) waren wie nachstehend: A/Bayern (92%, 91%), A/Wuhan (92%, 78%) und B/Beijing (59%, 50%). Die GMT nach der Immunisierung und die Vielfachen des Anstiegs der GMT waren zwischen den zwei Altersgruppen
- 10 vergleichbar. Der Prozentsatz der Personen (Erwachsene bzw. Ältere), die nicht-schützende Grundlinientiter besaßen, aber nach der Immunisierung schützende Spiegel erreichten, war wie nachstehend: A/Bayern (79%, 85%), A/Wuhan (86%, 56%) und B/Beijing (48%, 41%).
- 15 Eine zweite mukosale Vakzinzubereitung enthielt 7,5 µg HA und 12 µg Procholeragenoid (PCG). Diese Zubereitung wurde ebenfalls gut vertragen und erwies sich als etwas weniger immunogen als die HLT-Zubereitung. Der Prozentsatz der Personen, die schützende Serum-Anti-HA-Antikörpertiter erreichten, war wie nachstehend: A/Bayern 94,2%, A/Wuhan 80,8% und B/Beijing
- 20 36,5%. Die Serokonversionsraten aller Gruppen sind in Tabelle 4 gezeigt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die auf intranasalem Weg verabreichte virosomale Influenzavakzine sicher und sehr immunogen bei erwachsenen Personen, einschließlich Älteren, ist.

25

### BEISPIEL 9

Mukosale Immunantwort in Mäusen nach intranasaler Anwendung einer virosomalen Influenzavakzine mit HLT, mit PCG oder ohne zusätzliches mukosales Adjuvans

30

Gruppen von 10 erwachsenen weiblichen Balb/c-Mäusen wurden intranasal mit 30 µl entweder der im Beispiel (1) beschriebenen Influenzavakzine oder der im Beispiel

(2) beschriebenen Influenzavakzine geimpft. Eine Kontrollgruppe von 10 Mäusen erhielt eine virosomale Vakzinzubereitung ohne zusätzliches Adjuvans, aber mit der gleichen Virosomenzusammensetzung. Eine Hälfte jeder Gruppe erhielt eine zweite intranasale Dosis eine Woche später. Nasenwäschen (NW) und Bronchoalveolarspülungen (BAL) wurden 3 Wochen später durchgeführt. Tabelle 5 zu Bsp. 9. Die Bestimmung des spezifischen IgA wurde durch ein bekanntes ELISA-Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse (GMT) sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

10 Die höchsten GMT für alle drei Vakzinstämme (A/Johannesburg, A/Nanching, B/Harbin) konnten in der Gruppe nachgewiesen werden, die zweimal mit der Vakzine gemäß Beispiel (1) geimpft worden war. Diese Gruppe reagierte sogar mit den höchsten IgA-Spiegeln in BAL, nachdem sie nur einmal geimpft worden war.

15 Eine zufriedenstellende IgA-Antwort wurde auch in der Gruppe von Mäusen erhalten, die zweimal intranasal mit der Zubereitung von Beispiel (2) geimpft worden war. Die Kontrollgruppe, auf die die Virosomenzubereitung ohne zusätzliches mukosales Adjuvans angewendet worden war, zeigte nur eine sehr schwache mukosale Immunantwort.

20 Die Ergebnisse zeigen, daß in Mäusen eine intranasal verabreichte virosomale Influenzavakzine, die ein mukosales Adjuvans enthält, eine hohe mukosale Antikörperantwort induzieren konnte.

25 **VORKLINISCHE STUDIE DER VIROSOMALEN INFLUENZAVAKZINE  
IN MÄUSEN: INTRANASALE ANWENDUNG  
(Tabelle 5 zu Bsp. 9)**

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Tag 0	Infl.- Viros.+ HLT i. n.	Infl.- Viros.+ HLT i. n.	Infl.- Viros.+ PCG i. n.	Infl.- Viros.+ PCG i. n.	Influenza- Virosomen	Influenza- Virosomen
Tag 7	Infl.- Viros.+ HLT i. n.	—	Infl.- Viros.+ PCG i. n.	—	Infl.-Virus i. n.	—
Tag 28	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL	NW & BAL

- 28 -

## IgA-Influenza-Antikörper in Mäusen

GMT der reziproken Titer (ELISA)  
(Tabelle 6 zu Bsp. 9)

Gruppen	H1N1 NW	H1N1 BAL	H3N2 NW	H3N2 BAL	B NW	B BAL
1	320	12800	380	3200	320	9220
2	neg.	140	Neg.	24	neg.	1540
3	160	760	470	760	220	770
4	neg.	neg.	Neg.	neg.	10	neg.
5	4	neg.	Neg.	neg.	4	neg.
6	neg.	neg.	Neg.	neg.	neg.	neg.

5

Beispiel 10

## Klinische Bewertung einer mukosalen Hepatitis-B- (HBs-) Vakzine

Die Vakzine wurde gemäß Beispiel 4 hergestellt und in einem Nasenspray-  
 10 Applikator gemäß Beispiel 5 abgefüllt. Das Produkt wurde in 10 Freiwilligen  
 getestet: Je 100 µl in jedes Nasenloch wurden an Tag 1 appliziert und eine Woche  
 später wiederholt. Blutproben wurden am Tag 1 (vor der Impfung) sowie am Tag 29  
 entnommen. Die Anti-HBs-Antikörper wurden mittels RIA (Abbott) bestimmt. Das  
 geometrische Mittel des Titors vor der Impfung war 7 IU/ml und am Tag 29 159  
 15 IU/ml.

BEISPIEL 11

Mukosale Immunantwort von Mäusen nach intranasaler Anwendung eines DNA-  
 20 Plasmids, das für das HN-Antigen von Mumpsvirus kodiert, eingebracht in  
 Influenzavirosomen, die 10% kationische Phospholipide enthalten, und gemischt  
 mit HLT (5 µg/ml)

Wir immunisierten Gruppen von Mäusen intranasal mit a) nackter DNA, die für das  
 25 HN-Antigen des Mumpsvirus kodierte (Gruppe C) oder b) in Virosomen  
 eingeschlossener DNA nach Vorimmunisierung mit Virosomen (Gruppe A) oder c)  
 ohne Vorimmunisierung (Gruppe B). Eine Kontrollgruppe (H) wurde i. n. mit

- lebendem Urabe-Mumpsvirus (Priorix, SKB Rixensart) immunisiert. Wie in Tabelle 7 gezeigt ist, war das geometrische Mittel des Titers (GMT) der IgG in der Gruppe von Mäusen, die die Präimmunisierung erhalten hatten (A), höher als der in den Gruppen B und C der Mäuse beschriebene (Lovell GH: Proteosomes, hydrophobic anchors, iscoms and liposomes for improved presentation of peptide and protein vaccines. In: New Generation Vaccines (1990) (G. C. Woodrow und M. M. Levine, Hrsg.) Dekker, New York, S. 141-168; Cusi MG und Glück R: Intranasal immunization of mice with mumps DNA entrapped into influenza virosomes. IBC's 4th Annual Conference on Genetic Vaccines, 25.-27. Okt. 1998, Washington D.C.).
- 5 Die Gruppe von Mäusen, die i. n. mit nackter DNA immunisiert worden war, entwickelte einen sehr niedrigen IgG-Spiegel, wogegen die i. n. mit dem Mumpsvirus immunisierten Mäuse (Gruppe H) eine gute IgG-Antwort zeigten. Bei der Analyse der mukosalen Immunität fanden wir, daß alle Gruppen von Mäusen, außer den mit nackter DNA immunisierten, IgA entwickelten. Nur in den
- 10 Nasenwäschen (NW) der i. n. mit dem Mumpsvirus immunisierten Mäuse konnten wir einen erhöhten Titer an IgA nachweisen (Gruppe H).

- Cytokinmessungen wurden unter Verwendung von primären Milzzellen aus Mäusemilzen durchgeführt, die zwölf Tage nach der Immunisierung entnommen
- 20 wurden. Die Tabelle 8 faßt repräsentative Messungen zusammen, die aus zwei getrennten Experimenten erhalten wurden. Mit Mumpsvirusantigen stimulierte Zellen aus Mäusen, die zuvor (i. n.) mit DNA-Virosomen geimpft worden waren, induzierten die Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$ . Außerdem induzierten mit Grippe infizierte Mäuse die Produktion von IL-4. Aus den mit Mumpsvirus immunisierten
- 25 Tieren entnommene Zellen produzierten IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 und IL-10 nach in-vitro-Stimulation mit Mumpsantigen. Die Immunisierung mit DNA-Virosomen wie die Kontrollimmunisierung mit den gereinigten Mumpsantigenen korrelierten mit dem Th1-Phänotyp. Außerdem dominierte, berücksichtigt man das Verhältnis zwischen dem IgG-Gesamtspiegel und dem virusspezifischen IgG1 oder IgG2a, die Menge
- 30 an IgG2a-Isotyp in der Gruppe A, was eine Th2-Antwort anzeigt.

Tabelle 7: Das geometrische Mittel der Titer (GMT) von humoralen IgG, IgA in der Bronchoalveolarspülung (BAL) und IgA in der Nasenwäsche bei Mäusen

MÄUSE	IgG	BAL IgA	NW IgA
Gruppe A	356	8	10
Gruppe B	15	11	10
Gruppe C	12	2	2
Gruppe H	1585	2	20

5 Tabelle 8: Repräsentationsmessungen der Cytokinproduktion in Mäusen, erhalten aus zwei getrennten Experimenten

Gruppe	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10
A	300	300	150	0
B	150	625	0	0
C	300	100	0	0
D	600	100	150	600

### BEISPIEL 12

Behandlung von verstopfter Nase bei Freiwilligen mittels Influenzavirosomen mit und ohne HLT in einem neuen Sprayapplikator

10

In einer Klinik wurden 30 Freiwillige mit Erkältungssymptomen und akut verstopfter Nase ausgewählt. Bei sämtlichen Freiwilligen wurde die Atmungsintensität durch jedes einzelne Nasenloch rhinomanometrisch (in Pascal) gemessen. Anschließend wurden sie randomisiert und in 3 Gruppen zu 10 eingeteilt. Gruppe A erhielt eine Dosis Impfstoff (100  $\mu$ l in jedes Nasenloch) gemäß Beispiel (1), Gruppe B erhielt die gleiche Dosis, jedoch ohne das mukosale Adjuvans HLT, Gruppe C erhielt je 100  $\mu$ l 0,9% NaCl (physiologische Kochsalzlösung) in jedes Nasenloch. Die Luftströme wurden 15 min, 30 min, 1 Stunde sowie 2 Stunden später gemessen.

15

20 Die Messdaten sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Sowohl in Gruppe A und B waren die Werte signifikant besser als in Gruppe C. In beiden Gruppen konnte eine deutliche Besserung der Atemfunktionen festgestellt werden.



Tabelle 9: Rhinomanometrische geometrische Mittelwerte bei Freiwilligen vor und nach Spray-Behandlung

Gruppe	Atmungsintensität in Pascal				
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
A	490	693	712	681	521
B	497	687	705	672	538
C	488	497	513	521	501

5

### BEISPIEL 13

Behandlung von Mukosaläsionen in Freiwilligen mittels Influenzavirosomen und HLT

Freiwillige wurden intranasal geimpft, wie im Bsp. (7) beschrieben. Wie hier beschrieben, wurden die durchschnittlichen Becherzellen 3, 7 und 28 Tage nach der intranasalen Vakzination bestimmt. Wir konnten Epithelveränderungen mit Becherzellhyperplasie in cytologischen Abstrichen bestimmen (Glück U, Gebber J-O: Nasal cytopathology in smokers: a possible biomarker of air pollution? Am. J. Rhinol. 10 (1996) 55-57). Becherzellen haben eine Schutzfunktion für die muköse Schicht. Einen Monat nach der ersten nasalen Vakzination war der zelluläre Zustand der Mukosa signifikant besser verglichen mit dem vorherigen Zustand.

Diese neue Vakzine kann daher als Therapeutikum zur Behandlung einer Nasenschleimhaut im geschädigten Zustand verwendet werden.

20

### BEISPIEL 14

Prävention von enterotoxischer *E. coli*-Diarrhoe mittels nasaler Applikation von HLT mit und ohne Influenzavirosomen

Eine Gruppe von Reisenden, die Tunesien besuchten, bestand aus 38 Personen. Nach der informierten Einwilligung stimmten alle der Teilnahme an der Studie zu. Nach Randomisierung wurden 19 Freiwillige zweimal im Abstand von 1 Woche mit der Zubereitung gemäß Bsp. (1) geimpft, wogegen 19 Personen keinen Impfstoff erhielten. 28 Tage nach der ersten intranasalen Impfung wurden Blutproben von allen Freiwilligen abgenommen. Die 19 geimpften Personen zeigten hohe IgG-

- Spiegel im Serum gegen das mukosale Adjuvans (HLT). Die Kontrollgruppe blieb Anti-HLT-negativ. Bevor sie Tunesien verließen, einen Monat später, wurde ein spezielles Gesundheitsereignisformular an alle Teilnehmer verteilt. Die Gruppe kehrte 20 Tage später aus Tunesien zurück, und das ausgefüllte
- 5 Gesundheitsereignisformular wurde auf Diarrhoeerkrankungen ausgewertet. In der Gruppe der Geimpften berichteten nur zwei Personen über Diarrhoeprobleme, wogegen in der nichtgeimpften Gruppe 9 Personen während des Aufenthalts in Tunesien an Diarrhoe litten. Diese Daten zeigen, daß die Vakzine auch zur Verhinderung von Diarrhoe der enterotoxischen *E.-coli*-Erkrankung wirksam ist.

10

Beispiel 7: Tabelle 1: Klinisches Protokoll

Vakzin - Grupp e	N (männlich)	Mittleres Alter in Jahren	Anzahl der Vakzination en (Abstand)	Anwen- dung	Zusammen- setzung in µg vollständ. Vakzination: HA pro Stamm	Zusammen- setzung in µg vollständ. Vakzination: HLT
A	20 (14)	39,7	2 (1 Woche)	intranasal	15	2
B	20 (14)	35,5	2 (1 Woche)	intranasal	15	—
C	20 (16)	43,8	1	intranasal	15	2
D	20 (14)	41,2	1	intra- muskulär	15	—

5

PATENTANSPRÜCHE

1. Vakzine zur intranasalen Applikation, bestehend aus:
  - (a) Influenzaoberflächenproteinen, welche liposomal formuliert sind (Virosomen);
  - 10 (b) mukosalem Adjuvans bakteriellen Ursprungs;
  - (c) spezifischem Sprayapplikator, der so konstruiert ist, daß nahezu 100% des Spraystosses vollumfänglich auf die für die Wirksamkeit wichtige Nasenschleimhaut appliziert werden kann.
- 15 2. Vakzine nach Anspruch 1, wobei das Influenzaoberflächenprotein Hämagglutinin HA ist.
3. Vakzine nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Influenzaoberflächenproteine Hämagglutinin HA und Neuraminidase NA sind.
- 20 4. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 3, welche weitere Antigene enthält.
5. Vakzine nach Anspruch 4, wobei die weiteren Antigene an der Oberfläche der Virosomen gebunden sind.
- 25 6. Vakzine nach einem der Ansprüche 4 und 5, wobei die Antigene Antigene pathogener Organismen sind.
7. Vakzine nach Anspruch 6, wobei der pathogene Organismus ein Virus, ein  
30 Bakterium, ein Pilz oder ein Parasit ist.

8. Vakzine nach Anspruch 7, wobei das Virus, das Bakterium, der Pilz oder der Parasit ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Hepatitis A-Virus, Hepatitis B-Virus, respiratorisches Syncytial-Virus (Pneumovirus), Parainfluenzavirus, Mumpsvirus, Morbillivirus, HIV, Diphtherie-Bakterium (Corynebacterium diphtheriae), Tetanusbazillus (Clostridium tetani), Pneumokokken, Haemophilus influenzae, E. coli, Candida albicans, Candida tropicalis, Candida pseudotropicalis, Candida parapsilosis, Candida krusei, Aspergillus-Arten, Trichomonas-Arten, Trypanosoma-Arten, Leishmania-Arten, Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Trematoden-Arten und Nematoden-Arten.
9. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das ein Influenzavakzine ist.
10. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 9, welche zur Prävention und/oder Behandlung allgemeiner Infektionen/Infektionskrankheiten angewandt werden kann.
11. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Prävention und/oder Behandlung von Influenzaerkrankungen.
12. Vakzine nach Anspruch 10 oder 11 zur Prävention und/oder Behandlung von verstopfter Nase.
13. Vakzine nach einem der Ansprüche 10, 11 oder 12 zur Behandlung von Verletzungen von Nasenschleimhäuten.
14. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei der Hämagglutinin-Gehalt pro Dosis (100 µl) zwischen 1 - 30 µg, mit Vorteil zwischen 3 - 10 µg und am besten bei 3.75 µg liegt.
15. Vakzine nach einem der Ansprüche 2 bis 14, wobei das Verhältnis Liposomen-Phospholipid zu HA zwischen 1:10 und 20:1 liegt.

16. Vakzine nach Anspruch 15, wobei das Verhältnis Liposomen-Phospholipid zu HA zwischen 1:1 bis 10:1 liegt.
- 5 17. Vakzine nach einem der Ansprüche 15 und/oder 16 wobei das Verhältnis bei 3:1 liegt.
18. Vakzine nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei das Phospholipid der Liposomen ausgewählt ist aus der Gruppe von neutralen, kationischen und anionischen Phospholipiden
- 10
19. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das mukosale Adjuvans ein aktives Toxin, ein inaktives Toxin und/oder ein nicht-toxisches Derivat hiervon ist.
- 15
20. Vakzine nach Anspruch 19, wobei das Toxin und/oder das nicht-toxische Derivat hiervon *Heat Labile Toxin* (HLT), *Cholera toxin* (CT) und/oder *Procholeragenoid* (PCG) ist.
- 20 21. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 20, welche *Heat Labile Toxin* (HLT) und/oder *Cholera toxin* (CT) in einem Verhältnis enthält, das zwischen 1:2 bis 20:1, besser zwischen 1:1 und 1:10 und am besten bei 7,5:1 liegt.
22. Vakzine nach einem der Ansprüche 19 und 20, welche das hitzeinaktivierte *Procholeragenoid* (PCG), durch Rekombinantentechnologie inaktive HLT und/oder *Cholera toxin* (CT) als mukosales Adjuvans enthält, welches im Verhältnis HA:PCG (und/oder rHLT, und/oder rCT) zwischen 3:1 bis 1:20 liegt.
- 25
23. Vakzine nach Anspruch 22, wobei das Verhältnis HA:PCG (und/oder rHLT, und/oder rCT) zwischen 1:1 und 1:10 liegt.
- 30

24. Vakzine nach Anspruch 23, wobei das Verhältnis HA:PCG (und/oder rHLT, und/oder rCT) 1:2 ist.
25. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 24, welche weiterhin DNS- und/oder  
5 RNS-plasmide gebunden an und/oder in Virosomen enthält.
26. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 25, das eine Influenzavakzine ist.
27. Mukales Adjuvans nach einem der Ansprüche 1 bis 26, das *Heat Labile Toxin*  
10 (HLT), welches aus E.coli mit einem Laktose-Puffer gemäß Beispiel 2 eluiert wird und auf einer Chromatographiesäule mit Lactosyl-Gel (Pharmacia) gereinigt wird, ist.
28. Manschette (24) mit einer Verbindungseinrichtung (28) zum Anordnen an  
15 einer Abgabeeinrichtung (2), insbesondere zur sprühenden Abgabe einer pharmazeutisch wirksamen Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 27, und einer Abstützeinrichtung (30), wobei die Verbindungseinrichtung (28) und die Abstützeinrichtung (30) derart angeordnet sind, daß sie zusammen einen optimalen Sprühwinkel ( $\alpha$ ) für die Abgabe der Substanz von der  
20 Abgabeeinrichtung definieren.
29. Manschette (24) nach Anspruch 28, wobei der Sprühwinkel ( $\alpha$ ) zwischen 50° und 80° zur Horizontalen liegt.
- 25 30. Manschette (24) nach Anspruch 28 oder 29, wobei die Verbindungseinrichtung (28) ein im wesentlichen zylindrischer Rohrabschnitt ist.
31. Manschette (24) nach Anspruch 30, wobei der Rohrabschnitt (28) zumindest  
30 über einen Teil eines Nasenstücks (20) der Abgabeeinrichtung (2) schiebbar ist.

32. Manschette (24) nach einem der Ansprüche 28 bis 31, wobei die Abstützeinrichtung (30) am benutzerseitigen Ende derart gebogen ist, daß sie im wesentlichen der Form eines Außenabschnitts der Oberlippe eines Benutzers entspricht.
- 5
33. Manschette (24) nach einem der Ansprüche 28 bis 32, wobei die Manschette (24) drehfest an der Abgabeeinrichtung (2) angeordnet werden kann.
34. Manschette (24) nach Anspruch 33, wobei der Rohrabschnitt (28) und der Teil  
10 des Nasenstücks (20), über den der Rohrabschnitt (28) geschoben werden kann, zumindest teilweise polygonförmig ausgebildet sind, um eine Verdrehsicherung auszubilden.
35. Abgabeeinrichtung (2), insbesondere zur sprühenden Abgabe einer  
15 pharmazeutisch wirksamen Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 27, mit einer Pumpeinrichtung (6), einer Fingermanschette (10) zur Betätigung der Pumpeinrichtung (6), einem Anschlußelement (8) zum dichten Verbinden mit einem Vorratsbehälter (4) und einem Nasenstück (16), das einen ersten Abschnitt (18) und einen zweiten Abschnitt (20) aufweist, wobei die beiden  
20 Abschnitte (18, 20) des Nasenstücks (16) derart dimensioniert sind, daß eine Sprühöffnung (14) des Nasenstücks (16) im wesentlichen bis zu Nasenhaupthöhle eines Patienten ragt.
36. Abgabeeinrichtung (2) nach Anspruch 35, wobei zumindest der zweite  
25 Abschnitt (20) des Nasenstücks (16) im wesentlichen zylindrischen ausgebildet ist.
37. Abgabeeinrichtung (2) nach Anspruch 36, wobei der Durchmesser des  
30 zweiten Abschnitts (20) zwischen 3 mm und 10 mm liegt, bevorzugt etwa 7 mm beträgt.

38. Abgabeeinrichtung (2) nach einem der Ansprüche 35 bis 37, wobei der zweite Abschnitt (20) des Nasenstücks (16) eine Länge zwischen 5 und 50 mm, bevorzugt etwa 20 mm aufweist.
- 5 39. Abgabeeinrichtung (2) nach einem der Ansprüche 35 bis 38, wobei der erste Abschnitt (18) des Nasenstücks (16) eine Länge zwischen 10 und 40 mm, bevorzugt etwa 30 mm aufweist.
- 10 40. Abgabeeinrichtung (2) nach einem der Ansprüche 35 bis 39, wobei die Distanz zwischen der Fingermanschette (10) und der an einer Spitze vorgesehenen Sprühöffnung (14) mindestens 30 mm, bevorzugt etwa 45 mm beträgt.
41. Abgabeeinrichtung (2) nach einem der Ansprüche 35 bis 40 mit einer Manschette (24) nach einem der Ansprüche 28 bis 34.
- 15 42. Abgabeeinrichtung (2) nach Anspruch 41, die einteilig beziehungsweise einstückig mit der Manschette (24) ausgebildet ist.



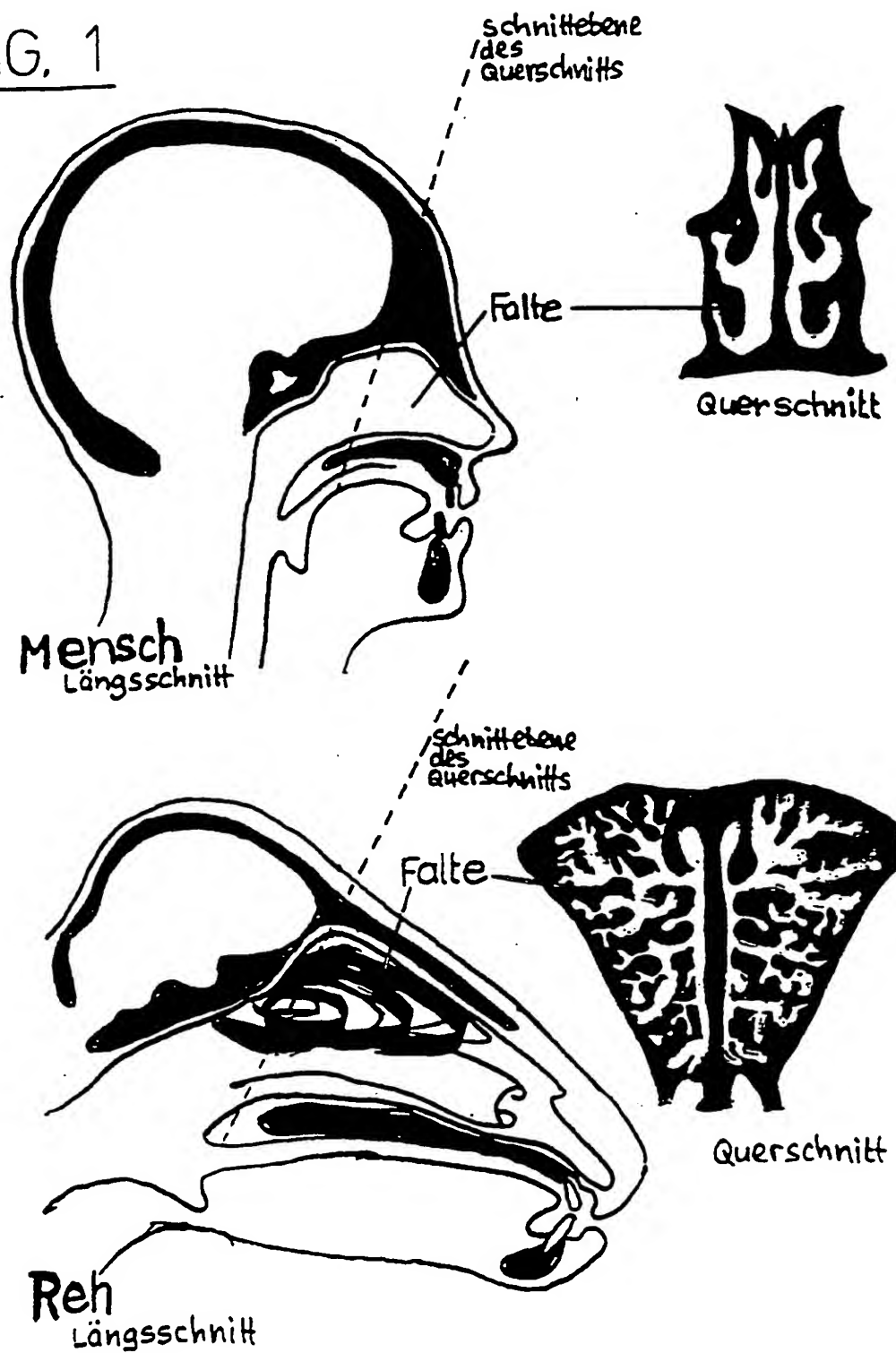
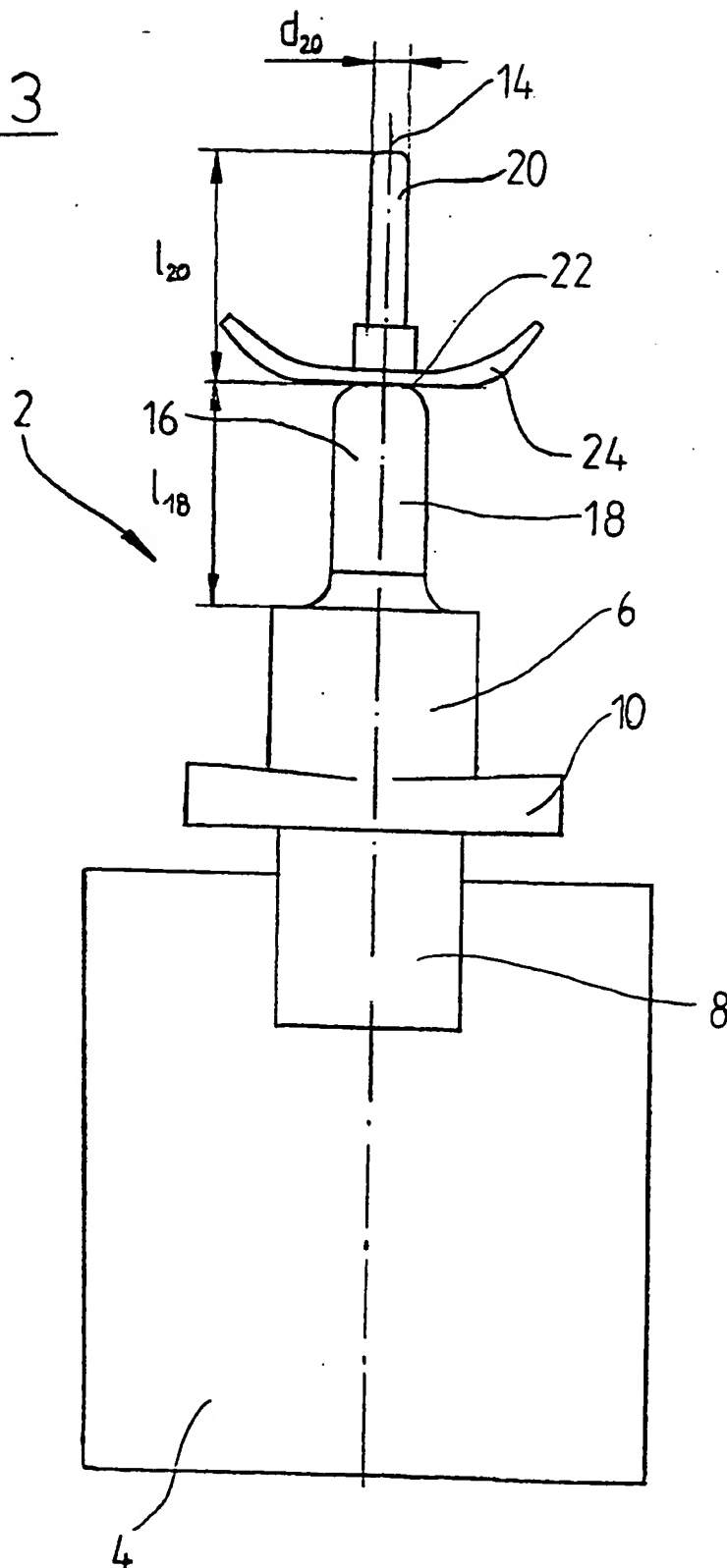
FIG. 1



FIG. 2

FIG. 3

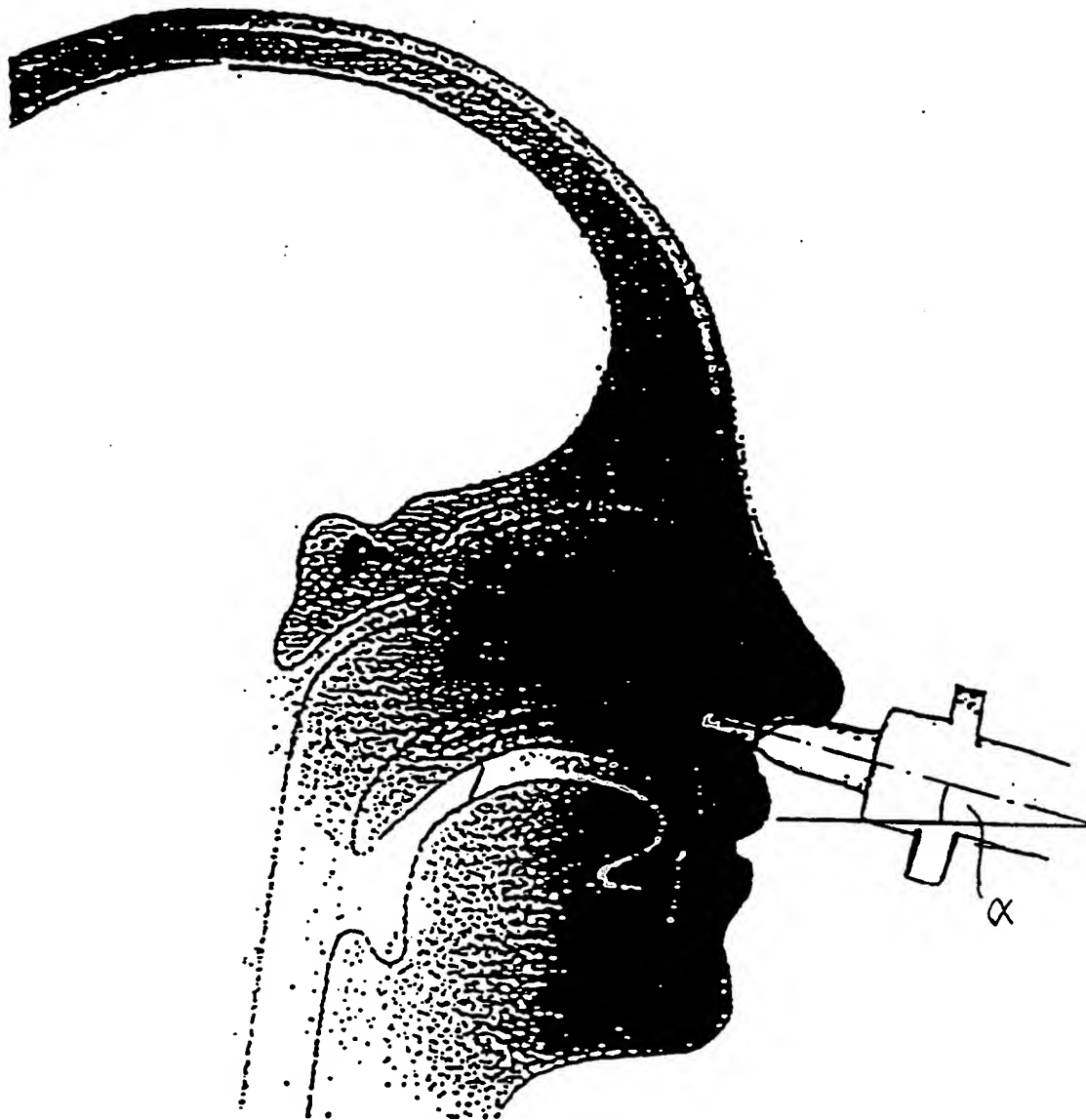
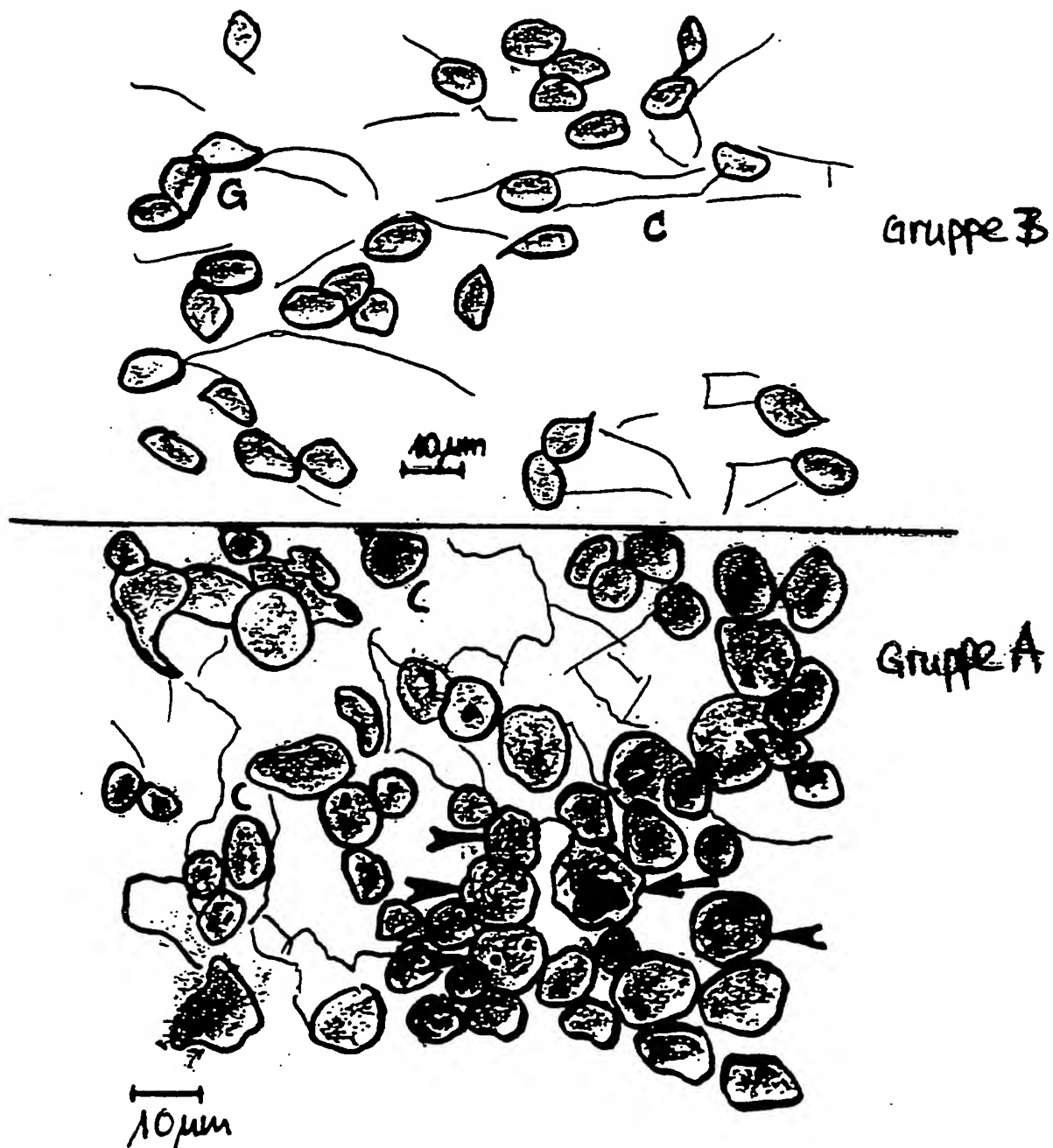
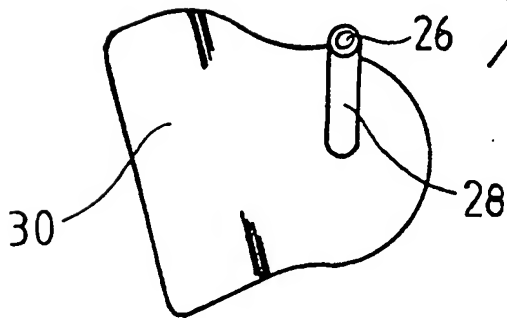
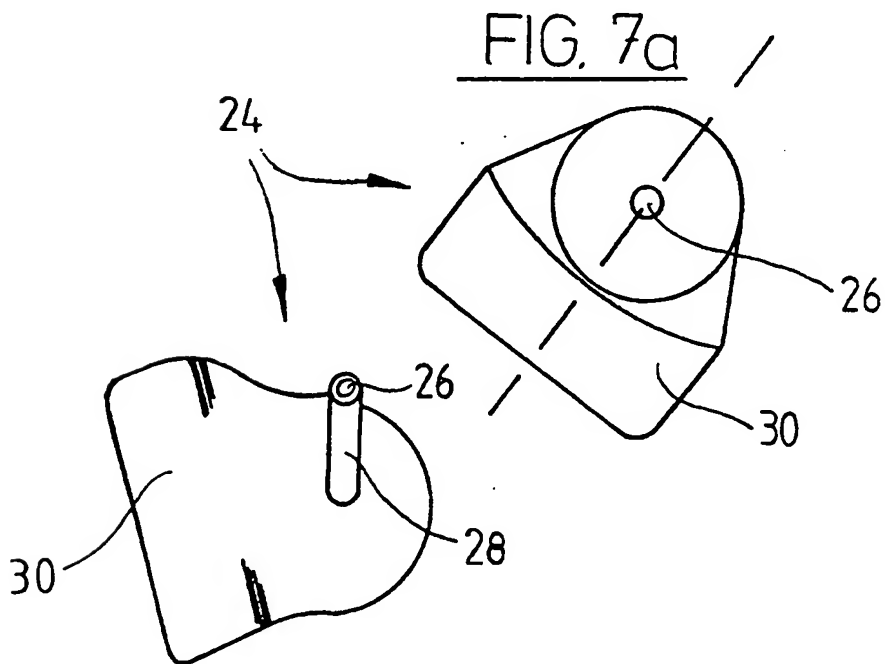
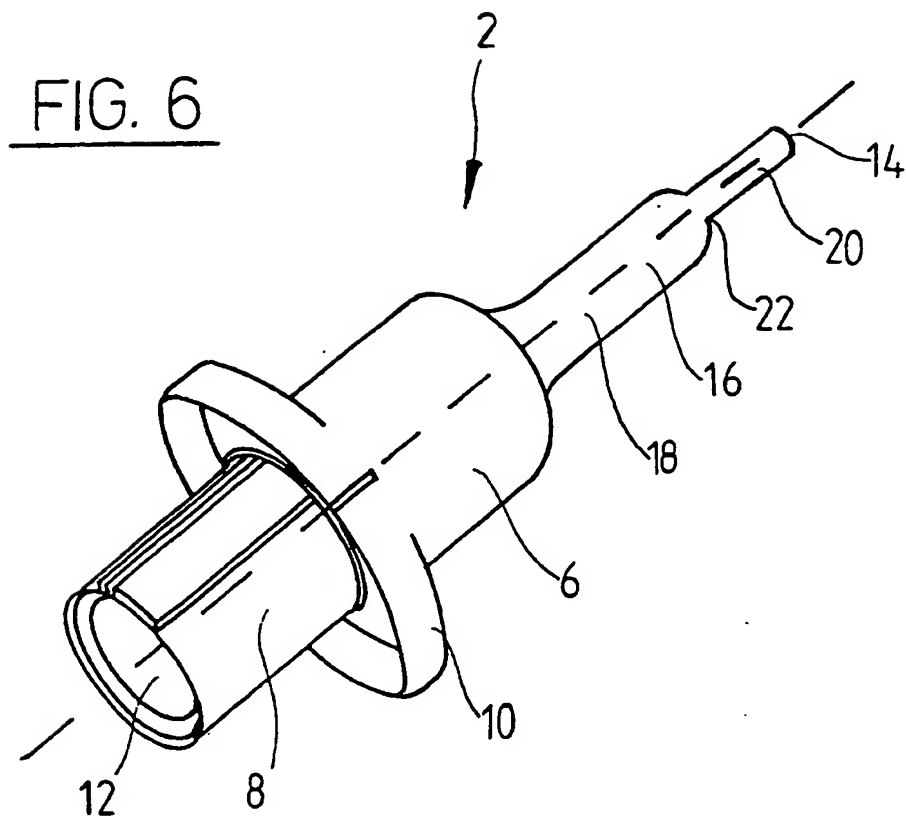


FIG. 4

FIG. 5



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : A61K 39/145, 39/295, 9/127, 39/39, B05B 11/00, A61P 11/02, A61M 15/08		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/27430
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	18. Mai 2000 (18.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08557		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AT (Gebrauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DE (Gebrauchsmuster), DK, DK (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. November 1999 (08.11.99)		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(30) Prioritätsdaten: 198 51 282.1      6. November 1998 (06.11.98)      DE		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. November 2000 (23.11.00)	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHWEIZ. SERUM- & IMPFINSTITUT BERN [CH/CH]; Postfach, CH-3001 Bern (CH).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GLÜCK, R. [CH/CH]; Chaseralstrasse 156, CH-3095 Spiegel Bern (CH). GLÜCK, U. [CH/CH]; Flossenmatt 12, CH-6045 Meggen/Luzern (CH). COLLIOUD, André [CH/CH]; Rütibühlweg 10, CH-3073 Gümligen (CH).			
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).			
(54) Title: COMPOSITION CONSISTING OF INFLUENZA VIRUS SURFACE PROTEINS AND DISPENSING DEVICE			
(54) Bezeichnung: ZUSAMMENSETZUNG BESTEHEND AUS INFLUENZAVIRUSOBERFLÄCHENPROTEIN, UND ABGABEEINRICHTUNG			
(57) Abstract			
The present invention relates to an improved pharmaceutical substance in addition to an improved dispensing device that allows for more effective nasal administration of a substance.			
(57) Zusammenfassung			
Die vorliegende Erfindung betrifft eine verbesserte pharmazeutische Substanz sowie eine verbesserte Abgabeeinrichtung, die zum wirksameren nasalen Applizieren einer Substanz ausgebildet ist.			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Letland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08557

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/145 A61K39/295 A61K9/127 A61K39/39 B05B11/00  
 A61P11/02 A61M15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B05B A61K A61M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE MEDLINE [Online]            US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM),            BETHESDA, MD, US            CRYZ S J JR ET AL: "Immunopotentiating            reconstituted influenza virosomes as a            novel antigen delivery system."            retrieved from STN            Database accession no. 1998214897            XP002140450            Entry month (EM) 199808            abstract            -&amp; DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL            STANDARDIZATION, (1998) 92 219-23.,            vol. 92, 1998, pages 219-223, XP000914674            the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-26



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 September 2000

Date of mailing of the international search report

14 09. 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Villeneuve, J-M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08557

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FORD M J ET AL: "INTRANASAL IMMUNIZATION WITH INACTIVATED INFLUENZA VIRUS AND VIROSOMES" VACCINES (COLD SPRING HARBOR) 1991,1991, pages 209-216, XP000914630 ISSN: 0899-4072 the whole document	1-3, 9-20,26
A	--- CHOUDHRY MA ET AL: "60-fold purification of cell-bound heat labile enterotoxin of Escherichia coli by simple affinity chromatography" MED SCI RES, vol. 23, no. 4, 1995, pages 267-268, XP000920838 the whole document	27
A	--- US 5 182 109 A (AIZAWA CHIKARA ET AL) 26 January 1993 (1993-01-26) the whole document	1-26
A	--- BELSHE RB ET AL: "The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children" N ENG J MED, vol. 338, no. 20, May 1998 (1998-05), pages 1405-12, XP000914636 the whole document	1-26
A	--- MENGIARDI B ET AL: "Virosomes as carriers for combined vaccines" VACCINE, vol. 13, no. 14, 1995, pages 1306-1315, XP002140447 the whole document	1-26
A	--- HAAN DE A ET AL: "MUCOSAL IMMUNOADJUVANT ACTIVITY OF LIPOSOMES: INDUCTION OF SYSTEMIC IGG AND SECRETORY IGA RESPONSES IN MICE BY INTRANASAL IMMUNIZATION WITH AN INFLUENZA SUBUNIT VACCINE AND COADMINISTERED LIPOSOMES" VACCINE, vol. 13, no. 2, 1 February 1995 (1995-02-01), pages 155-162, XP000615909 ISSN: 0264-410X the whole document	1-26
	--- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08557

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R I WALKER ET AL: "Use of Heat-labile Toxin of Enterotoxigenic Escherichia coli to Facilitate Mucosal Immunization" VACCINE RESEARCH,US,MARY ANN LIEBERT, INC.; PUBLISHERS, vol. 1, no. 2, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 1-10, XP002077884 the whole document	1-26
A	EP 0 869 181 A (BIOCINE SPA) 7 October 1998 (1998-10-07) the whole document	22
A	PIERCE NF ET AL: "Procholeragenoid: A safe and effective antigen for oral immunization against experimental cholera" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 40, no. 3, 1983, pages 1112-11118, XP000914626 cited in the application the whole document	22
A	EP 0 412 524 A (TOKO YAKUHI KOGYO KK) 13 February 1991 (1991-02-13) the whole document	1-26
A	EP 0 170 198 A (ANASCO GMBH) 5 February 1986 (1986-02-05) the whole document	1-26
P,X	GLÜCK R: "Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs)" VACCINE, vol. 17, March 1999 (1999-03), pages 1782-1787, XP002140448 the whole document	1-27
P,X	GLÜCK U ET AL: "Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli Heat-Labile Toxin in adult volunteers" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 7780-7786, XP002140449 the whole document	1-27
P,X	FR 2 764 807 A (VALOIS SA) 24 December 1998 (1998-12-24)  page 5, line 22 - line 28; claims; figures	28, 30-36, 41,42
	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08557

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 739 294 A (LHD LAB HYGIENE DIETETIQUE) 4 April 1997 (1997-04-04)  page 3, line 34 -page 4, line 24; figures ---	28,30, 31,33, 35,36, 38,42
X	US 5 797 390 A (MC SOLEY THOMAS E) 25 August 1998 (1998-08-25) claims 1,2; figures ---	28,31
X	US 2 434 875 A (TURNBULL) 20 January 1948 (1948-01-20) column 12, line 3 - line 30; figures ---	28,35
A	FR 1 257 220 A (CHANDAVOINE) 12 July 1961 (1961-07-12) -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/08557

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
1-26 (in part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See supplemental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions, as follows :

1. Claims Nos. 1-27

Influenza vaccines, defined in Claim No.1 and mucosal adjuvant as defined in Claim No. 27

2. Claims Nos. 28-42

Spray applicator as defined in Claims Nos. 28 and 35.

Continuation of box I.2

Claims Nos. 1-26 (in part)

Patent Claim 1 relates to a vaccine for intranasal administration, containing influenza virosomes combined with an adjuvant and a spray applicator. Since one vaccine is defined solely by its contents and not by its form of packaging (here : the applicator, which in addition is only characterized by a desirable quality i.e. the provision of 100% efficacy), the patent claim lacks the clarity required in Article 6 of the PCT. The lack of clarity is such that it is impossible to search the entire scope of protection sought in a meaningful manner. The search was therefore directed at parts of the patent claims which appear to be clear, i.e. subsidiary points a and b of Claim 1 : vaccines for intranasal application consisting of influenza virosomes and mucosal adjuvants of a bacterial origin.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08557

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5182109 A	26-01-1993	JP 2243633 A	27-09-1990
		JP 2849632 B	20-01-1999
		CA 1335571 A	16-05-1995
		DE 3911442 A	02-11-1989
		FR 2629717 A	13-10-1989
		GB 2217600 A,B	01-11-1989
		KR 9603378 B	09-03-1996
EP 0869181 A	07-10-1998	IT 1253009 B	10-07-1995
		AT 177145 T	15-03-1999
		AU 3347693 A	28-07-1993
		CA 2127091 A	08-07-1993
		DE 69228563 D	08-04-1999
		DE 69228563 T	29-07-1999
		WO 9313202 A	08-07-1993
		EP 0620850 A	26-10-1994
		ES 2127808 T	01-05-1999
		GR 3029556 T	30-06-1999
		JP 7506240 T	13-07-1995
		MX 9207685 A	31-05-1994
		SG 48217 A	17-04-1998
EP 0412524 A	13-02-1991	JP 2922935 B	26-07-1999
		JP 3198866 A	30-08-1991
		DE 69001223 D	06-05-1993
		DE 69001223 T	08-07-1993
		US 5064122 A	12-11-1991
EP 0170198 A	05-02-1986	DE 8422872 U	25-10-1984
		AT 52701 T	15-06-1990
		DE 3577661 D	21-06-1990
		ES 296053 U	16-07-1987
FR 2764807 A	24-12-1998	EP 0988079 A	29-03-2000
		WO 9857690 A	23-12-1998
FR 2739294 A	04-04-1997	NONE	
US 5797390 A	25-08-1998	NONE	
US 2434875 A	20-01-1948	NONE	
FR 1257220 A	12-07-1961	NONE	



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K39/145 A61K39/295 A61K9/127 A61K39/39 B05B11/00  
A61P11/02 A61M15/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B05B A61K A61M

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US CRYZ S J JR ET AL: "Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes as a novel antigen delivery system." retrieved from STN Database accession no. 1998214897 XP002140450 Entry month (EM) 199808 Zusammenfassung -&amp; DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, (1998) 92 219-23., Bd. 92, 1998, Seiten 219-223, XP000914674 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">— -/-</p>	1-26

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14.09.2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Villeneuve, J-M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FORD M J ET AL: "INTRANASAL IMMUNIZATION WITH INACTIVATED INFLUENZA VIRUS AND VIROSOMES" VACCINES (COLD SPRING HARBOR) 1991,1991, Seiten 209-216, XP000914630 ISSN: 0899-4072 das ganze Dokument	1-3, 9-20,26
A	CHOUDHRY MA ET AL: "60-fold purification of cell-bound heat labile enterotoxin of Escherichia coli by simple affinity chromatography" MED SCI RES, Bd. 23, Nr. 4, 1995, Seiten 267-268, XP000920838 das ganze Dokument	27
A	US 5 182 109 A (AIZAWA CHIKARA ET AL) 26. Januar 1993 (1993-01-26) das ganze Dokument	1-26
A	BELSHE RB ET AL: "The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children" N ENG J MED, Bd. 338, Nr. 20, Mai 1998 (1998-05), Seiten 1405-12, XP000914636 das ganze Dokument	1-26
A	MENGIARDI B ET AL: "Virosomes as carriers for combined vaccines" VACCINE, Bd. 13, Nr. 14, 1995, Seiten 1306-1315, XP002140447 das ganze Dokument	1-26
A	HAAN DE A ET AL: "MUCOSAL IMMUNOADJUVANT ACTIVITY OF LIPOSOMES: INDUCTION OF SYSTEMIC IGG AND SECRETORY IGA RESPONSES IN MICE BY INTRANASAL IMMUNIZATION WITH AN INFLUENZA SUBUNIT VACCINE AND COADMINISTERED LIPOSOMES" VACCINE, Bd. 13, Nr. 2, 1. Februar 1995 (1995-02-01), Seiten 155-162, XP000615909 ISSN: 0264-410X das ganze Dokument	1-26
	-/-	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	R I WALKER ET AL: "Use of Heat-labile Toxin of Enterotoxigenic Escherichia coli to Facilitate Mucosal Immunization" VACCINE RESEARCH,US,MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, Bd. 1, Nr. 2, 1. Januar 1993 (1993-01-01), Seiten 1-10, XP002077884 das ganze Dokument	1-26
A	EP 0 869 181 A (BIOCINE SPA) 7. Oktober 1998 (1998-10-07) das ganze Dokument	22
A	PIERCE NF ET AL: "Procholeragenoid: A safe and effective antigen for oral immunization against experimental cholera" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 40, Nr. 3, 1983, Seiten 1112-1118, XP000914626 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	22
A	EP 0 412 524 A (TOKO YAKUHI KOGYO KK) 13. Februar 1991 (1991-02-13) das ganze Dokument	1-26
A	EP 0 170 198 A (ANASCO GMBH) 5. Februar 1986 (1986-02-05) das ganze Dokument	1-26
P,X	GLÜCK R: "Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs)" VACCINE, Bd. 17, März 1999 (1999-03), Seiten 1782-1787, XP002140448 das ganze Dokument	1-27
P,X	GLÜCK U ET AL: "Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli Heat-Labile Toxin in adult volunteers" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 73, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 7780-7786, XP002140449 das ganze Dokument	1-27
P,X	FR 2 764 807 A (VALOIS SA) 24. Dezember 1998 (1998-12-24)  Seite 5, Zeile 22 - Zeile 28; Ansprüche; Abbildungen	28, 30-36, 41,42
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 739 294 A (LHD LAB HYGIENE DIETETIQUE) 4. April 1997 (1997-04-04)  Seite 3, Zeile 34 -Seite 4, Zeile 24; Abbildungen	28,30, 31,33, 35,36, 38,42
X	US 5 797 390 A (MCSOLEY THOMAS E) 25. August 1998 (1998-08-25) Ansprüche 1,2; Abbildungen	28,31
X	US 2 434 875 A (TURNBULL) 20. Januar 1948 (1948-01-20) Spalte 12, Zeile 3 - Zeile 30; Abbildungen	28,35
A	FR 1 257 220 A (CHANDAVOINE) 12. Juli 1961 (1961-07-12)	

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-26 (teilweise)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgetaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-26 (teilweise)

Patentanspruch 1 bezieht sich auf ein Vakzin zur intranasalen Verabreichung beinhaltend Influenza-Virosomen in Kombination mit einem Adjuvans und einem Sprayapplikator. Da ein Vakzin nur definiert ist durch seinen Inhaltsstoff und nicht durch seine Verpackungsform (hier der Applikator, der zusätzlich nur durch eine erstrebenswerte Eigenschaft, nämlich die Vermittlung der 100%igen Wirksamkeit, charakterisiert ist) fehlt diesem Patentanspruch die in Artikel 6 PCT geforderte Klarheit. Dieser Mangel an Klarheit macht eine sinnvolle Recherche über den gesamten Schutzbereich unmöglich. Die Recherche wurde daher auf die Teile des Patentanspruchs gerichtet, welche als klar erscheinen, nämlich die Unterpunkte a und b des Anspruchs 1: Vakzine zur intranasalen Applikation bestehend aus Influenza-Virosomen und mukosalem Adjuvans bakteriellen Ursprungs.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-27

Influenza-Vakzine, definiert in Anspruch 1 und mukosales Adjuvans wie in Anspruch 27 definiert.

2. Ansprüche: 28-42

Sprayapplikator wie in Ansprüchen 28 und 35 definiert.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08557

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5182109 A	26-01-1993	JP 2243633 A	27-09-1990
		JP 2849632 B	20-01-1999
		CA 1335571 A	16-05-1995
		DE 3911442 A	02-11-1989
		FR 2629717 A	13-10-1989
		GB 2217600 A, B	01-11-1989
		KR 9603378 B	09-03-1996
EP 0869181 A	07-10-1998	IT 1253009 B	10-07-1995
		AT 177145 T	15-03-1999
		AU 3347693 A	28-07-1993
		CA 2127091 A	08-07-1993
		DE 69228563 D	08-04-1999
		DE 69228563 T	29-07-1999
		WO 9313202 A	08-07-1993
		EP 0620850 A	26-10-1994
		ES 2127808 T	01-05-1999
		GR 3029556 T	30-06-1999
		JP 7506240 T	13-07-1995
		MX 9207685 A	31-05-1994
		SG 48217 A	17-04-1998
EP 0412524 A	13-02-1991	JP 2922935 B	26-07-1999
		JP 3198866 A	30-08-1991
		DE 69001223 D	06-05-1993
		DE 69001223 T	08-07-1993
		US 5064122 A	12-11-1991
EP 0170198 A	05-02-1986	DE 8422872 U	25-10-1984
		AT 52701 T	15-06-1990
		DE 3577661 D	21-06-1990
		ES 296053 U	16-07-1987
FR 2764807 A	24-12-1998	EP 0988079 A	29-03-2000
		WO 9857690 A	23-12-1998
FR 2739294 A	04-04-1997	KEINE	
US 5797390 A	25-08-1998	KEINE	
US 2434875 A	20-01-1948	KEINE	
FR 1257220 A	12-07-1961	KEINE	